

CARINE FERREIRA DE SOUZA

**EFEITO DO TREINAMENTO ANAERÓBIO DE SALTOS SOBRE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS SANGÜÍNEOS E FUNCIONALIDADE DE NEUTRÓFILOS E
LINFÓCITOS DE RATOS DIABÉTICOS**



CURITIBA

2007

CARINE FERREIRA DE SOUZA

**EFEITO DO TREINAMENTO ANAERÓBIO DE SALTOS SOBRE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS SANGÜÍNEOS E FUNCIONALIDADE DE NEUTRÓFILOS E
LINFÓCITOS DE RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes.

CURITIBA

2007

***A Deus, o Senhor da minha vida,
a meus pais Antonio e Rita, o
motivo da minha perseverança e
aos meus ratos que morreram no
decorrer dos experimentos por
meu descuido.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor, pela paciência e pela fé. Também pelos amigos do Grupo de Oração Nossa Senhora de Pentecostes, do Grupo de Oração Universitário e da Pastoral de Rua.

A meus pais Antonio e Rita, por sempre confiarem em mim, pelo apoio em todas as decisões que tomei na vida e pelo exemplo de honestidade, trabalho e bondade. Ao meu irmão Rodrigo, pelo companheirismo, pelo sorriso lindo, pela ajuda à distância e por me emprestar seu computador para finalização deste trabalho.

Ao professor Luiz Cláudio Fernandes pelo exemplo de docente e pesquisador, pela oportunidade, pela confiança, pelo incentivo, pelos conselhos sempre oportunos e por ser uma pessoa tão especial.

Ao professor Edilson Serpeloni Cyrino pela constante motivação mesmo à distância, pelas oportunidades, pela amizade e pelo GEPEMENE. Você contribuiu para este trabalho do começo ao fim, não conseguiria caminhar se não fosse pela base sólida que me proporcionou, MUITO OBRIGADA!

Aos professores Anita Nishiyama, Edilson Serpeloni Cyrino e Sílvia Marques Zanata, pela leitura deste trabalho e pela ajuda no decorrer deste processo, sempre que solicitados.

Aos companheiros Ana Lúcia, Everson, Fabíola, Fernanda e Sandro, pela leitura deste trabalho, sugestões e contribuições, vocês tiveram um papel fundamental na finalização deste trabalho, parabéns vocês foram show!

Ao meu grande amigo e co-orientador Everson, pela paciência e confiança depositada em mim. Obrigada pelos: “calma Carine!”, que sempre chegavam em momento oportuno e caíam como bálsamo. Você é um exemplo de profissionalismo e companheirismo. É muito bom trabalhar contigo.

Aos companheiros de laboratório que muito me ensinaram e que cresceram junto comigo: Cris, Diogo, Lóli, Luciéle, Ricardo, Sandro, Sérgio e Vanessa. Especialmente, a Luciéle, por ser amiga do Marcelo Romanzini... Pela acolhida, por ser meu anjinho e me apresentado a este laboratório, que com seus altos e baixos é tudo o que sonhei durante a minha graduação, por tudo o que me ensinou, pelas suas loucurinhas e alegria desmedidas.

Aos mestrandos e estagiários que me permitiram ensinar o que aprendi e que, com humildade, estão crescendo neste processo de ensino/aprendizagem e pela amizade diária: Andressa, Carina, Luciana, Paulo, Cristiane, Danielle Pequito, Jaisson, Márcio, Paulo e Victor.

Às mais que estagiárias, amigas: Janaína, Luiza e Isabela.

A Carina, Luciana, Márcio e Victor, por terem me ajudado a treinar meus ratinhos com tanta dedicação e carinho: muito obrigada.

Ao Everson, Fabíola, Fernanda, Luis Alexandre e Luiz Cláudio pela inquietante busca de aprendizagem e pela grande humildade em ensinar, muito obrigada por tudo o que me ensinaram.

Aos companheiros de divagações profissionais e/ou pessoais Everson, Fabíola, Fernanda, Gleisson, Luis Alexandre, Marcelo e Pedro, não ficarão livres de mim tão cedo, ainda teremos muitos agradáveis bate-papos.

Às companheiras de dia-a-dia: Dani Berbel, Josi e Roberta, que suportaram minhas fases mal-humoradas, que riram comigo de várias coisas... e também de nada... Que com seus defeitos e qualidades me ensinam a ser uma pessoa melhor... e que, não compreendendo muitas de minhas atitudes, relevaram com paciência, vocês serão eternamente especiais pra mim.

Aos mais que amigos, verdadeiros anjos que Deus colocou em minha vida: Andréia, Fábio e Josi, amo muito vocês.

Aos amigos que mesmo distantes sempre estiveram muito presentes, principalmente meus queridos irmãos Éder e Paulo Godeguêz. Obrigada Éder pelas partilhas no *messenger*... Paulo, nunca vou me esquecer do telefonema do Mato Grosso... Vocês são especiais pra mim!

Aos meus lindos ratinhos, os mais lindos! rs rs Por serem únicos, obedientes, ótimos saltadores (treinados) e exemplos de sobrevivência (diabéticos), vocês me ensinaram a amar mais os animais e a amar mais a vida.

Aos funcionários do biotério Ana, Cândido, Júlio, Luizão e Terezinha pelo cuidado de meus ratos e por me ajudarem sempre prontamente, quando solicitados. Obrigada pelos sorrisos e “Bom dias”.

A todos os funcionários do Setor de Ciências Biológicas, do Restaurante Universitário e seguranças por serem sempre prestativos e simpáticos.

***“Não que sejamos capazes por
nós mesmos de ter algum
pensamento, como de nós
mesmos. Nossa capacidade vem
de Deus”
(2 Coríntios 3, 5)***

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS E QUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO....	xii
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Diabetes Mellitus	1
1.2 Células do Sistema Imunitário	6
1.2.1 Neutrófilos	6
1.2.2 Linfócitos	8
1.3 Diabetes Mellitus e Sistema Imunitário	10
1.4 Diabetes Mellitus e Treinamento com Pesos	13
1.5 Treinamento com Pesos e Sistema Imunitário	18
2 JUSTIFICATIVA.....	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Delineamento Experimental	24
4.2 Amostra.....	24
4.3 Indução do Diabetes Experimental	25
4.4 Protocolo de Treinamento de Saltos	25
4.5 Instrumentos.....	26
4.5.1 Enzimas e reagentes	26
4.5.2 Equipamentos para análises	27
4.6 Ortotanásia dos Animais	27
4.7 Parâmetros Bioquímicos	28
4.7.1 Mensuração plasmática de glicose	28
4.7.2 Mensuração plasmática de lipídios	28
4.7.3 Mensuração plasmática de lactato	28
4.8 Contagem Diferencial de Leucócitos Sangüíneos	29

4.9 Contagem de Células	30
4.10 Isolamento de Neutrófilos Sangüíneos	30
4.11 Ensaios com Neutrófilos	31
4.11.1 Soluções	31
4.11.2 Capacidade fagocítica.....	31
4.11.3 Produção de ânion superóxido	32
4.12 Obtenção de Linfócitos Mesentéricos.....	32
4.13 Proliferação de Linfócitos	32
4.14 Análise de Dados	33
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Parâmetros Analisados Durante o Período Experimental	35
5.2 Parâmetros Bioquímicos Sangüíneos.....	40
5.3 Parâmetros Imunitários	44
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICES	82
ANEXO.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

1-RM	– Uma Repetição Máxima.
abs	– Absorbância.
ADP	– Adenosina Difosfato.
AGE	– Produtos Avançados de Glicosilação Não-enzimática.
AMP	– Adenosina Monofosfato.
AMPC	– Adenosina Monofosfato Cíclica.
AMPK	– Adenosina Monofosfato Quinase.
ANOVA	– Análise de variância.
ATP	– Adenosina Trifosfato.
BPI	– Proteína Bactericida e Indutora de Permeabilidade.
CNPq	– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
Con A	– Concanavalina A.
cpm	– Contagem Por Minuto.
DMSO	– Dimetilsulfóxido.
DNA	– Ácido Desoxirribonucléico.
EDTA	– Ácido Tetra Acético de Etilenodiamina.
EPM	– Erro Padrão da Média.
ERO	– Espécies Reativas de Oxigênio.
fMLP	– Formil Metionil Leucil Fenilalanina.
GAPDH	– Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase.
GLUT	– Proteínas Transportadoras de Glicose.
Grb2	– Proteína Ligadora 2 do Receptor de Fator de Crescimento.
GTP	– Guanosina Trifosfato.
H ₂ O ₂	– Peróxido de Hidrogênio.
HbA _{1C}	– Hemoglobina Glicada 1C.
hCAP-18	– <i>Human Cathelicidin Antimicrobial Protein 18</i> .
HDL-C	– Colesterol Contido em Lipoproteínas de Alta Densidade.
i. v.	– Intravenosa.
IFN	– Interferon.
IGF	– Fator de Crescimento Similar à Insulina.
IL	– Interleucina.
IRS	– Substrato do Receptor de Insulina.
LPS	– Lipopolissacarídeo.
LT	– Linfotoxina.
MAPK	– Proteína Quinase Ativada por Mitógeno.

MSH	– Hormônio Estimulador de Melanócitos.
NAD ⁺	– Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidada.
NADH	– Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida.
NADP ⁺	– Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidada.
NADPH	– Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida.
NBT	– <i>Nitroblue Tetrazolium</i> .
NFκB	– Fator Nuclear κB.
NGAL	– Lipocalina Associada à Gelatinase dos Neutrófilos.
NK	– <i>Natural Killer</i> – Células Matadoras Naturais.
NOD	– <i>Non-obese Diabetic</i> .
NPH	– <i>Neutral Protamina Hagedorn</i> .
Nramp-1	– Proteína de Macrófago Associada à Resistência Natural 1.
O ₂ ⁻	– Ânion Superóxido.
p	– Peso.
p. c.	– Peso Corporal.
PAI-1	– Ativador-Inibidor de Plasminogênio 1.
PBS	– Solução Salina Tamponada com Sais de Fosfato.
PHOX	– Oxidase de Fagócitos.
PHA	– Fitohemaglutinina.
PI3-K	– Fosfatidilinositol 3-Quinase.
PKA	– Proteína Quinase A.
PKC	– Proteína Quinase C.
PMA	– Forbol Miristato Acetato.
RAGE	– Receptor para Produtos Avançados de Glicosilação Não-enzimática.
RM	– Repetições Máximas.
SH2	– Domínio 2 Homólogo a Src.
Shc	– Proteína Adaptadora de Ligação a Fosfotirosina contendo SH2.
SHP2	– Proteína Tirosina Fosfatase Contendo SH2.
TAG	– Triacilglicerol.
TCA	– Ácido Tricloroacético.
Th	– Linfócitos T <i>Helper</i> (Auxiliar).
TGF-β1	– Fator de Crescimento Transformador β1.
TNF	– Fator de Necrose Tumoral.
UI	– Unidade Internacional.
v	– Volume.
VO _{2máx}	– Consumo Máximo de Oxigênio.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Peso corporal nos momentos pré e pós-treinamento e variação absoluta e relativa do peso corporal entre os dois momentos dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado.....	36
Tabela 2 – Consumo médio alimentar e hídrico por 24 h dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante seis semanas de experimentação.....	36
Tabela 3 – Resumo das concentrações plasmáticas de glicose e lactato dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação.....	41
Tabela 4 – Resumo das concentrações plasmáticas de lipídios circulantes em repouso dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação.....	43
Tabela 5 – Resumo dos dados funcionais de neutrófilos sangüíneos dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação.....	47
Quadro 1 –Resumo do efeito do diabetes e do treinamento de saltos sobre os parâmetros bioquímicos sangüíneos analisados.....	44
Quadro 2 –Resumo dos efeitos do diabetes e do treinamento de saltos sobre a funcionalidade de neutrófilos sangüíneos e linfócitos obtidos de linfonodos mesentéricos.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção mitocondrial de ânion superóxido ativa as quatro principais vias de danos por hiperglicemia inibindo a enzima gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH).....	3
Figura 2 – Aumento no fluxo através da via de poliol decorrente de hiperglicemia...	4
Figura 3 – Produção de precursores de produtos avançados de glicosilação não-enzimática (AGE) e suas conseqüências patológicas.....	4
Figura 4 – Hiperglicemia aumenta o fluxo através da via da hexosamina.....	5
Figura 5 – Componentes e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase.....	8
Figura 6 – Função dos linfócitos Th1 e Th2 e citocinas tipo 1 e tipo 2 na regulação da imunidade celular e humoral.....	10
Figura 7 – Sinalização intracelular pela insulina.....	14
Figura 8 – Transdução de sinais pela insulina e pelo exercício.....	16
Figura 9 – Sistema de natação utilizado para o treinamento composto por tanques com água.....	26
Figura 10 –Peso corporal dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante seis semanas de experimentação.....	36
Figura 11 –Consumo alimentar por 24 h dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante seis semanas de experimentação.....	38
Figura 12 –Consumo hídrico por 24 h dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante seis semanas de experimentação.....	39
Figura 13 –Concentrações plasmáticas de glicose em repouso dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação.....	40
Figura 14 –Concentrações plasmáticas de lactato em repouso dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação.....	41
Figura 15 –Concentrações plasmáticas de triacilglicerol em repouso dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação.....	42
Figura 16 –Concentrações plasmáticas de colesterol total em repouso dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação.....	43

Figura 17 –Contagem diferencial de leucócitos sangüíneos dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado.....	45
Figura 18 –Capacidade fagocítica de neutrófilos sangüíneos dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado.....	46
Figura 19 –Produção de ânion superóxido pelos neutrófilos sangüíneos dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado.....	46
Figura 20 –Índice de proliferação de linfócitos mesentéricos cultivados por 66 h sob estímulo dos mitógenos concanavalina A (Con A) ou lipopolissacarídeo (LPS) dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado.....	48

RESUMO

Indivíduos diabéticos apresentam elevado catabolismo em consequência da deficiência de insulina. Diabetes mellitus também conduz a complicações micro e macrovasculares a longo prazo e disfunções no sistema imunitário. O treinamento anaeróbio de intensidade moderada aumenta a captação de glicose pela fibra muscular, ativa as vias anabólicas, bem como melhora a funcionalidade de células do sistema imunitário podendo otimizar a sobrevivência de indivíduos diabéticos. Portanto, o propósito do presente estudo foi analisar o efeito de um protocolo de treinamento anaeróbio de saltos sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos e funcionalidade de neutrófilos e linfócitos mesentéricos de ratos diabéticos. Para tanto, ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: controle, treinado, diabético e diabético-treinado. O diabetes experimental foi induzido intravenosamente por estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal em tampão citrato, pH 4,8). O treinamento de saltos consistiu em seis séries de 10 saltos em tanque de água com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal com um minuto de intervalo, quatro vezes por semana durante seis semanas. Então os animais foram ortotansados e amostras de sangue e linfonodos mesentéricos foram coletados. Concentrações plasmáticas de glicose, lactato, triacilglicerol e colesterol total foram mensuradas. A técnica de May Grünwald-Giemsa foi utilizada para contagem diferencial de leucócitos a partir do esfregaço de sangue dos animais. Neutrófilos sanguíneos foram isolados por gradiente de densidade e submetidos a ensaios de capacidade fagocítica e produção de ânion superóxido. Proliferação de linfócitos mesentéricos estimulados com concanavalina A (Con A) ou lipopolissacarídeo (LPS) foi analisada por incorporação de [2-¹⁴C]-timidina. Análise de variância de duas vias, seguida por pós-teste de Tukey, foram empregados para análise estatística. Diabetes experimental acarretou hiperfagia, polidipsia, hiperglicemia, hipertriacilglicerolemia e perda de peso corporal; o treinamento somente reverteu a hipertriacilglicerolemia. O treinamento de saltos aumentou a capacidade fagocítica e de produção de ânion superóxido por neutrófilos sanguíneos de ratos saudáveis, bem como a porcentagem de monócitos sanguíneos. Ratos diabéticos apresentaram neutrofilia e linfocitopenia, concomitante com aumento na produção de ânion superóxido por neutrófilos sanguíneos, enquanto que o treinamento de saltos provocou alteração adicional nestes parâmetros. A proliferação de linfócitos mesentéricos em ratos diabéticos foi maior quando estimulados com Con A e menor quando estimulados com LPS em comparação a proliferação de linfócitos de ratos controle. O treinamento de saltos foi capaz de reverter as alterações na proliferação de linfócitos desencadeadas pelo diabetes, contudo, quando estimulados com Con A esta alteração não alcançou valores de ratos não-diabéticos. O treinamento de saltos proposto no presente estudo pode alterar a prejudicada funcionalidade de neutrófilos sanguíneos e de linfócitos mesentéricos verificadas em ratos diabéticos, mesmo não alterando a glicemia, sugerindo efeito direto do treinamento sobre outros parâmetros atrelados as condições diabéticas como alteração no processo de glicosilação não-enzimática de proteínas, adaptações hormonais e modificação na ativação do complexo enzimático NADPH oxidase de neutrófilos, bem como no perfil de resposta de linfócitos T *helper* 1 e 2.

Palavras-chave: exercício físico; treinamento de saltos; diabetes mellitus; neutrófilo; linfócito.

ABSTRACT

Diabetic individuals show increased catabolism in consequence of insulin deficiency. Diabetes mellitus leads to long-term micro and macrovascular complications and immune dysfunctions. The moderate-intensity anaerobic training increases glucose uptake by muscle fiber, activates anabolic pathways as well as improves immune cells functionality that can ameliorate diabetic individual's survival. The present study investigated the effect of an anaerobic jump training on blood biochemical parameters, and neutrophils and mesenteric lymphocytes functionality from diabetic rats. Male Wistar rats were divided into four groups: sedentary, trained, diabetic and diabetic-trained. Experimental diabetes was induced by intravenous injection of streptozotocin (60 mg/kg body weight in citrate buffer, pH 4.8). The jump training consisted by six sets of 10 jumps in tank with water with overload equal to 50% of body weight with 1 minute of resting, four times a week during six weeks. Then individuals were killed, and blood sample and gut-associated lymphonodes were withdrawal. Plasma glucose, lactate, triacylglycerol and total cholesterol concentrations were measured. May Grünwald-Giemsa technique was utilized for differential leukocyte counting from individuals blood smear. Blood neutrophils were isolated by density gradient and submitted to phagocytic capacity and anion superoxide production assays. Lymphocyte proliferation using concanavalin A (Con A) or lipopolysaccharide (LPS) stimuli was studied by incorporation of [2-¹⁴C]-thymidine into DNA. Two-way analysis of variance and Tukey post hoc test were applied for statistical analysis. Experimental diabetes resulted in hyperphagia, polydipsia, hyperglycemia, hypertriacylglycerolemia, and body weight loss, where that the training reverse only the hypertriacylglycerolemia. The jump training increased phagocytic and anion superoxide capacity of blood neutrophils from health individuals as well as the percentage of blood monocytes. Diabetic individuals showed neutrophilia and lymphocytopenia, alone with increase in the anion superoxide production by blood neutrophils, while the jump training provoked additional alteration in these parameters. Gut-associated lymphocytes proliferation in diabetic individuals was higher as stimulated with Con A, and lesser as stimulated with LPS comparing to lymphocyte proliferation of sedentary individuals. The jump training was able to reverse the alterations in the lymphocyte proliferation caused by diabetes, however, was lower when compared to non-diabetic individual. The jump training purposed in the present study modifies the reduced blood neutrophils and gut-associated lymphocytes functionality verified in diabetic individuals, even not altering glycemia. This suggests a direct effect of the training on others parameters related to diabetic state such as changing in the process of protein non-enzymatic glycosylation, hormone adaptations and modification in the activation of neutrophil NADPH oxidase enzymatic complex as well as the response in the profile of lymphocytes T helper 1 and 2.

Keywords: physical exercise; jump training; diabetes mellitus; neutrophil; lymphocyte.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus é um grupo de disfunções metabólicas resultantes de defeitos na secreção da insulina, na ação da insulina ou de ambas. Estima-se que o número de pessoas com diabetes mellitus aumente de 150 milhões em 2000 para 220 milhões em 2010 e 300 milhões em 2025 (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001). Além disso, a estimativa da prevalência mundial de diabetes mellitus para todos os grupos etários em 2000 é de 2,8%, e em 2030 é de 4,4% (WILD et al., 2004). Ainda que a prevalência de obesidade permaneça estável até 2030, o que parece improvável, o número de pessoas com diabetes mellitus será maior do que o dobro em consequência do envelhecimento e urbanização da população. Contudo, estas estimativas provavelmente estão subestimando os valores reais, visto que dados da Federação Internacional de Diabetes indicam que aproximadamente 246 milhões de pessoas no mundo têm diabetes mellitus (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2007), sendo atualmente uma das doenças não-transmissíveis mais comuns. No Brasil, um censo realizado entre os anos de 1986 e 1989 pelo Ministério da Saúde e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com o apoio da Sociedade Brasileira de Diabetes, demonstrou uma prevalência de diabetes de 7,6% na população entre 30 e 69 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Os processos patogênicos envolvidos no desenvolvimento do diabetes mellitus variam da destruição auto-imune das células β pancreáticas, com conseqüente deficiência da secreção de insulina, a anormalidades que resultam na resistência à ação da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005). O diabetes mellitus apresenta muitas classificações, sendo as principais: diabetes mellitus tipo 1 (anteriormente denominado insulino-dependente ou juvenil) e tipo 2 (anteriormente denominado insulino-independente ou da maturidade). O diabetes mellitus tipo 1 corresponde a 5-10% do indivíduos diabéticos e resulta da destruição auto-imune das células β relacionada com múltiplas predisposições genéticas e fatores ambientais, ou de etiologias desconhecidas, denominada diabetes idiopática (BRESSON; VON HERRATH, 2004).

O diabetes mellitus tipo 2 varia de resistência à insulina predominante, com relativa deficiência de insulina, a um defeito predominante na secreção de insulina aliado a resistência à insulina. A maioria destes pacientes é obesa ou possui gordura corporal predominantemente localizada na região abdominal e geralmente não necessitam de insulina exógena para sobreviverem (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005). A produção de insulina nestes pacientes é insuficiente para contrapor a resistência periférica à insulina característica de indivíduos diabéticos tipo 2, resultando em insulinemia normal ou elevada, apesar da deficiência na sua secreção pelo pâncreas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005).

O diabetes mellitus não-controlado tem como conseqüências agudas a hiperglicemia com cetoacidose ou a síndrome hiperosmolar não-cetótica. Os sintomas característicos de hiperglicemia são poliúria, polidipsia, perda de peso corporal, muitas vezes com hiperfagia e visão confusa. A hiperglicemia em indivíduos diabéticos não-controlados pode, a longo prazo, acarretar diversas disfunções, tais como: retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica e neuropatia autonômica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005). Adicionalmente, entre pacientes com diabetes há elevada incidência de aterosclerose, doença arterial periférica e doença cerebrovascular.

Um mecanismo unificado foi apresentado por BROWNLEE (2005) para explicar as complicações diabéticas. Hiperglicemia intracelular aumenta a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela cadeia de transporte de elétrons. As ERO causam danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA), ativando poli-adenosina difosfato (ADP)-ribose polimerase, a qual modifica gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase, reduzindo a sua atividade. Finalmente, a diminuição da atividade de gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase ativa a via do poliol, aumenta a formação intracelular de produtos avançados de glicosilação não-enzimática (AGE), ativa proteína quinase C (PKC), a qual ativa fator nuclear κ B (NF κ B), e aumenta o fluxo na via das hexosaminas (Figura 1).

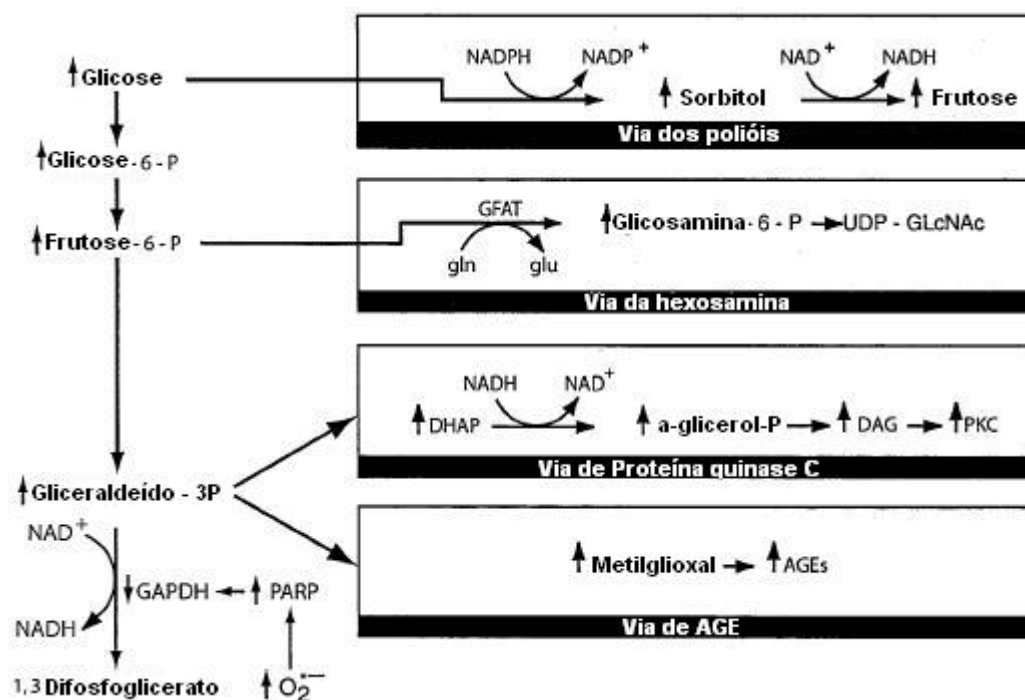


Figura 1 – Produção mitocondrial de ânion superóxido ativa as quatro principais vias de danos por hiperglicemia inibindo a enzima gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH). Fonte: BROWNLEE (2005, adaptado).

Na via do poliol, a aldose redutase, ao invés de catalisar a redução de aldeídos tóxicos, reduz glicose a sorbitol, consumindo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), precursora para a redução da enzima glutatona redutase, aumentando a suscetibilidade do compartimento intracelular ao estresse oxidativo (Figura 2).

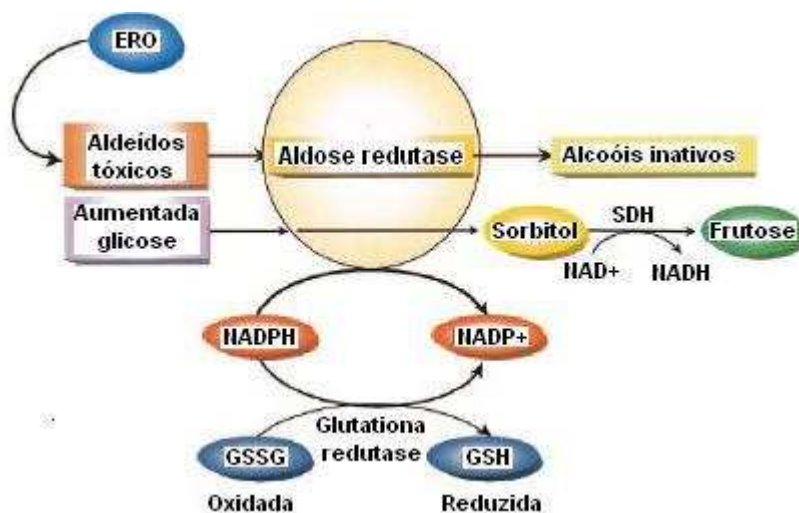


Figura 2 – Aumento no fluxo através da via de polioli decorrente de hiperglicemia.

Fonte: BROWNLEE (2001, adaptado). ERO – espécies reativas de oxigênio.

Produção de AGE conduz a modificação de proteínas intracelulares na célula endotelial, além de poderem se difundir para fora da célula e modificar moléculas da matriz extracelular ou proteínas no sangue, as quais causam produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento ao se ligarem a receptores para AGE (RAGEs), ativando-os (Figura 3).

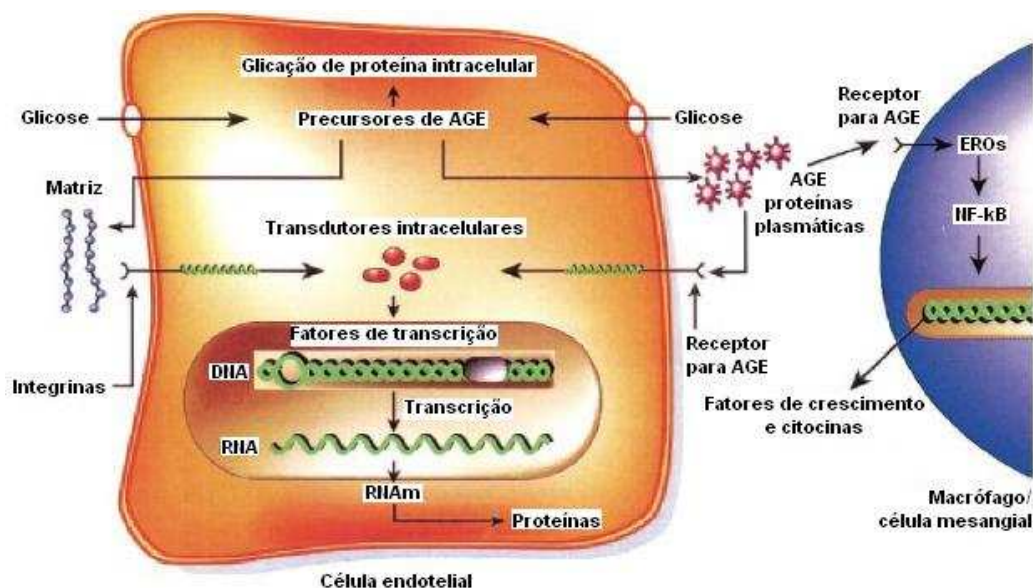


Figura 3 – Produção de precursores de produtos avançados de glicosilação não-enzimática (AGE) e suas consequências patológicas. Fonte: BROWNLEE (2001, adaptado). ERO – espécies reativas de oxigênio.

Hiperglicemia também produz intracelularmente diacilglicerol, o qual ativa PKC α , δ e β , conduzindo a uma variedade de efeitos sobre a expressão de genes pró-inflamatórios, além de anormalidades no fluxo sanguíneo. Na via da hexosamina, glicose é metabolizada pela via glicolítica e frutose-6 fosfato pode ser convertida em produtos que aumentam a expressão do fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1) e do ativador-inibidor de plasminogênio 1 (PAI-1) (Figura 4).

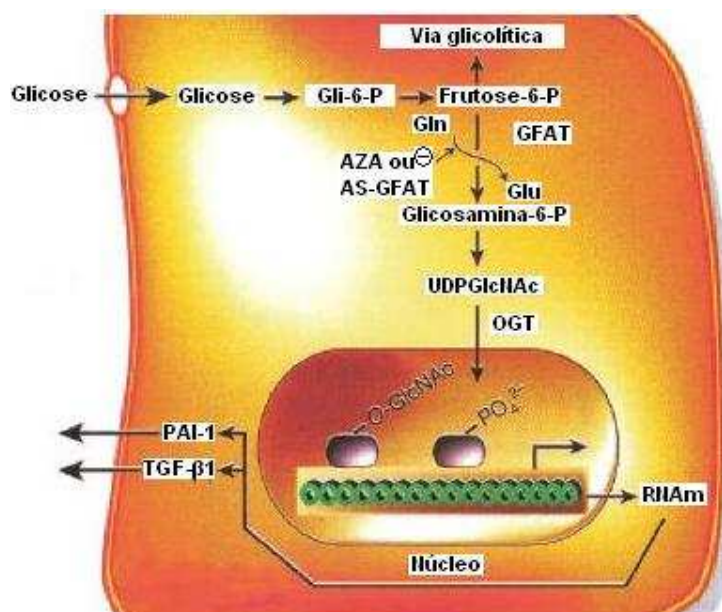


Figura 4 – Hiperglicemia aumenta o fluxo através da via da hexosamina. Fonte: BROWNLEE (2001, adaptado).

Uma alternativa para análises mais profundas é a utilização de animais como modelos experimentais visando avaliar parâmetros difíceis de serem observados em seres humanos devido a aspectos éticos e de saúde. Para isso, os modelos de intervenção devem ser delineados de modo que a maioria das respostas biológicas se aproximem das encontradas em seres humanos. O modelo de diabetes experimental induzido por substância químicas como aloxana e estreptozotocina, que possuem alta afinidade pelas células β pancreáticas, configura um quadro metabólico característico do diabetes mellitus tipo 1 (SZKUDELSKI, 2001).

O modelo de diabetes mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina em ratos é capaz de mimetizar muitas das complicações diabéticas acima mencionadas. WEI et al. (2003), acompanhando ratos por 24 semanas após administração intravenosa (i. v.) de estreptozotocina (65 mg/kg de peso corporal), verificaram estabilidade de sintomas do diabetes como hiperglicemia, hiperfagia e polidipsia. Adicionalmente, foi verificado desenvolvimento de catarata com presumível cegueira em 16 semanas, bem como alodinia tátil estável sete a 10 dias após indução. Houve elevada mortalidade, com somente 52% dos ratos diabéticos sobrevivendo às 24 semanas experimentais. Portanto, o modelo de diabetes mellitus

induzido por estreptozotocina é válido como base para intervenções e sua administração em ratos adultos resulta no quadro de diabetes mellitus tipo 1 (SZKUDELSKI, 2001).

Lipólise pode ser induzida por aumento de adenilato ciclase, adenosina monofosfato cíclica (AMPc), proteína quinase A (PKA) ou lipase sensível a hormônio. Estreptozotocina aumenta a taxa de lipólise por via independente de receptores β -adrenérgicos (na ausência de epinefrina), de AMPc (não é alterada na presença de insulina) e de PKA (não é alterada por tratamento com um inibidor – H-89), provavelmente estreptozotocina age sobre a enzima lipase sensível a hormônio, ou por alquilação de algumas estruturas celulares ou liberação de radicais livres ou óxido nítrico (SZKUDELSKI; SZKUDELSKA, 2002). Portanto, estudos que analisam o metabolismo lipídico de animais diabetizados durante um curto período de tempo com estreptozotocina devem ser analisados com cautela, visto que os resultados encontrados podem ainda sofrer ação significativa desta substância química e não refletir alterações do quadro de diabetes em si.

1.2 Células do Sistema Imunitário

1.2.1 Neutrófilos

Leucócitos polimorfonucleares, em sua maioria compostos por neutrófilos, representam papel crucial na primeira linha de defesa contra bactérias, fungos e protozoários invasores. A resposta inflamatória mediada por neutrófilos pode ser considerada um processo multipasso, envolvendo a adesão inicial de neutrófilos circulantes ao endotélio vascular ativo, subsequente extravasamento e migração de neutrófilos em direção ao foco inflamatório e a eliminação do microorganismo estranho através de fagocitose, produção de ERO e liberação de substâncias microbicidas. A maioria dos passos deste processo é dependente da mobilização de grânulos citoplasmáticos (grânulos azurófilos e grânulos negativos para peroxidase – grânulos de gelatinase e grânulos específicos) e vesículas secretórias. As diversas subclasses de grânulos contidos dentro dos neutrófilos constituem um importante reservatório, não somente de proteínas antimicrobianas, proteases e componentes da oxidase para o *burst* oxidativo, como também de uma ampla variedade de receptores de membrana para moléculas de adesão ao

endotélio, proteínas da matriz extracelular, produtos bacterianos e mediadores solúveis da inflamação (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Grânulos azurófilos possuem limitada exocitose em resposta a um estímulo, sendo creditados contribuírem primeiramente para a morte e degradação de microorganismos engolfados localizados no fagossomo. Ao encontrar bactérias, os neutrófilos ativam seus diversos sistemas antimicrobianos dependentes ou independentes de oxigênio, liberando grânulos azurófilos e específicos para o fagossomo ou para o compartimento extracelular (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Os grânulos azurófilos contêm mieloperoxidase, α -defensinas, proteína bactericida e indutora de permeabilidade (BPI) e seprocidinas, que são serina proteases com atividade microbica (proteínase-3, catepsina G e elastase). Grânulos de gelatinase são importantes reservatórios de enzimas para degradação da matriz extracelular e de receptores de membrana, necessárias durante extravasamento e diapedese por neutrófilos, enquanto grânulos específicos participam sobretudo das atividades antimicrobianas dos neutrófilos, mobilizando o seu arsenal de substâncias antimicrobianas para o fagossomo ou para o compartimento extracelular. Em conjunto, estes grânulos negativos para peroxidase possuem várias proteínas, incluindo lactoferrina, *human cathelicidin antimicrobial protein 18* (hCAP-18), lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL), lisozima e proteína de macrófago associada à resistência natural 1 (Nrap-1). Lactoferrina, hCAP-18 e NGAL são metaloproteínas capazes de degradar componentes estruturais da matriz extracelular incluindo colágeno, fibronectina, proteoglicanas, laminina e gelatina, possuindo importância central na degradação da membrana basal vascular e estruturas intersticiais durante o extravasamento e migração de neutrófilos.

Uma das principais funções dos neutrófilos é realizar o *burst* oxidativo. NADPH oxidase é uma cadeia de transporte de elétrons transmembrana que catalisa a produção de ânion superóxido (O_2^-) a partir de oxigênio e NADPH, de acordo com a seguinte reação:



Esta enzima é encontrada em fagócitos profissionais, tais como neutrófilos e macrófagos, possuindo a função de gerar agentes capazes de eliminar microorganismos em contato com os fagócitos, após sua internalização (BABIOR, 2004). Os agentes oxidantes gerados pela NADPH oxidase incluem peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) (por dismutação de ânion superóxido), HOCl (por oxidação de íon cloreto mediada por H_2O_2 , reação catalisada pela enzima mieloperoxidase), oxigênio *singlet* (por reação de HOCl e H_2O_2), ozônio e OH^\bullet (radical hidroxil) (pela oxidação de metais reduzidos por H_2O_2). A NADPH oxidase consiste de duas subunidades ligadas à membrana ($\text{gp91}^{\text{PHOX}}$ (PHOX – oxidase de fagócitos) e p22^{PHOX} , também denominadas em conjunto citocromo b_{558}), três subunidades citosólicas (p67^{PHOX} , p47^{PHOX} e p40^{PHOX}) e uma proteína G de baixo peso molecular ligada a nucleotídeo de guanina, rac 2 ou rac 1 (Figura 5) (BABIOR, 1999). No neutrófilo, p47^{PHOX} deve ser fosforilada para executar sua função de montar a oxidase. Ativação de PKC conduz a fosforilação de p47^{PHOX} , e subsequente migração das subunidades citosólicas para a membrana, onde se ligam ao citocromo b_{558} , resultando na montagem e ativação da oxidase (BABIOR; LAMBETH; NAUSEEF, 2002).

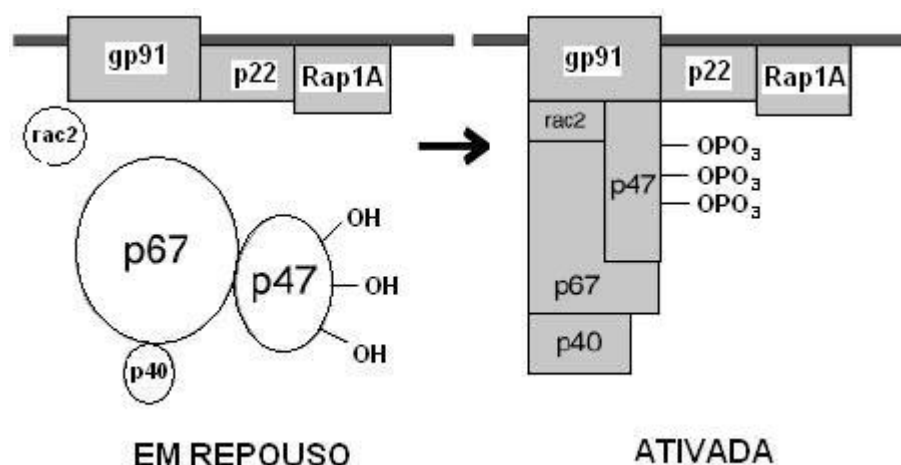


Figura 5 – Componentes e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase.
Fonte: BABIOR (1999, adaptado).

1.2.2 Linfócitos

Linfócitos são células importantes na resposta imunitária tanto humoral quanto celular e sua funcionalidade está relacionada não somente com a capacidade de defesa do organismo contra infecções, mas também com o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Os linfócitos podem ser classificados em linfócitos B e T, sendo estes últimos subdivididos em T *helper* (auxiliar) ou CD3-CD4^+ , T citotóxico ou CD3-CD8^+ e células matadoras naturais (NK – *natural killer*)

(ABBAS; LICHTMAN, 2005). Linfócitos T se originam na medula óssea e migram para o timo onde ocorre sua maturação. Os linfócitos T participam da resposta imunitária celular e proliferam-se ativamente quando estimuladas com interleucina (IL)-2 ou artificialmente por um mitógeno, como concanavalina A (Con A) ou fitohemaglutinina (PHA) (OTTON, 2001). Os linfócitos B se originam e maturam na medula óssea, sendo precursores de células produtoras de anticorpos (plasmócitos) e proliferam-se quando estimulados por antígenos específicos ou artificialmente com lipopolissacarídeo (LPS) de parede bacteriana ou mitógeno *pokeweed*. Linfócitos T citotóxicos possuem como principal função destruir células que expressam antígenos estranhos. Os linfócitos T *helper* são os principais coordenadores da resposta imunitária, uma vez que são necessários para a ativação das principais células efetoras. As células NK estão envolvidas na imunidade natural contra os vírus e outros organismos extracelulares, por meio de mecanismos líticos diretos e pela secreção de interferon (IFN) γ . As células NK não expressam receptores de antígenos distribuídos por clonagem como os receptores de linfócitos B e T, e a sua ativação é regulada por uma combinação de receptores estimuladores e inibidores da superfície celular (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Linfócitos T e B adquirem a capacidade de reconhecer antígenos através da expressão de receptores de superfície específicos, sendo a expressão dessas moléculas utilizada para distinguir as populações de linfócitos (CD3-CD4⁺ e CD3-CD8⁺, por exemplo).

Linfócitos T *helper* (Th) podem ser divididos em Th1 e Th2 e identificados de acordo com o perfil de citocinas produzidas e células por eles ativadas. Linfócitos Th1 são associados com imunidade mediada por células, enquanto linfócitos Th2, com imunidade humoral. O desenvolvimento de linfócitos Th1 ou Th2 é influenciado por estresse agudo ou crônico, lesões traumáticas, queimaduras, bem como exercício físico muito intenso (ELENKOV; CHROUSOS; WILDER, 2000). Linfócitos Th1 estão relacionados com a função de monócito/macrófagos e a falta de ativação de Th1 torna o organismo suscetível a infecções, enquanto linfócitos Th2 estão relacionados com linfócitos B, podendo reduzir a resposta mediada por Th1 (Figura 6; ELENKOV; CHROUSOS, 1999). O aumento de Th1 é identificado pelo modelo de citocinas que inclui IL-2, IL-12, IFN γ , linfotóxina (LT) e TGF β , ao passo que linfócitos Th2 são identificados pelo perfil de citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) α (ELENKOV; CHROUSOS, 1999).

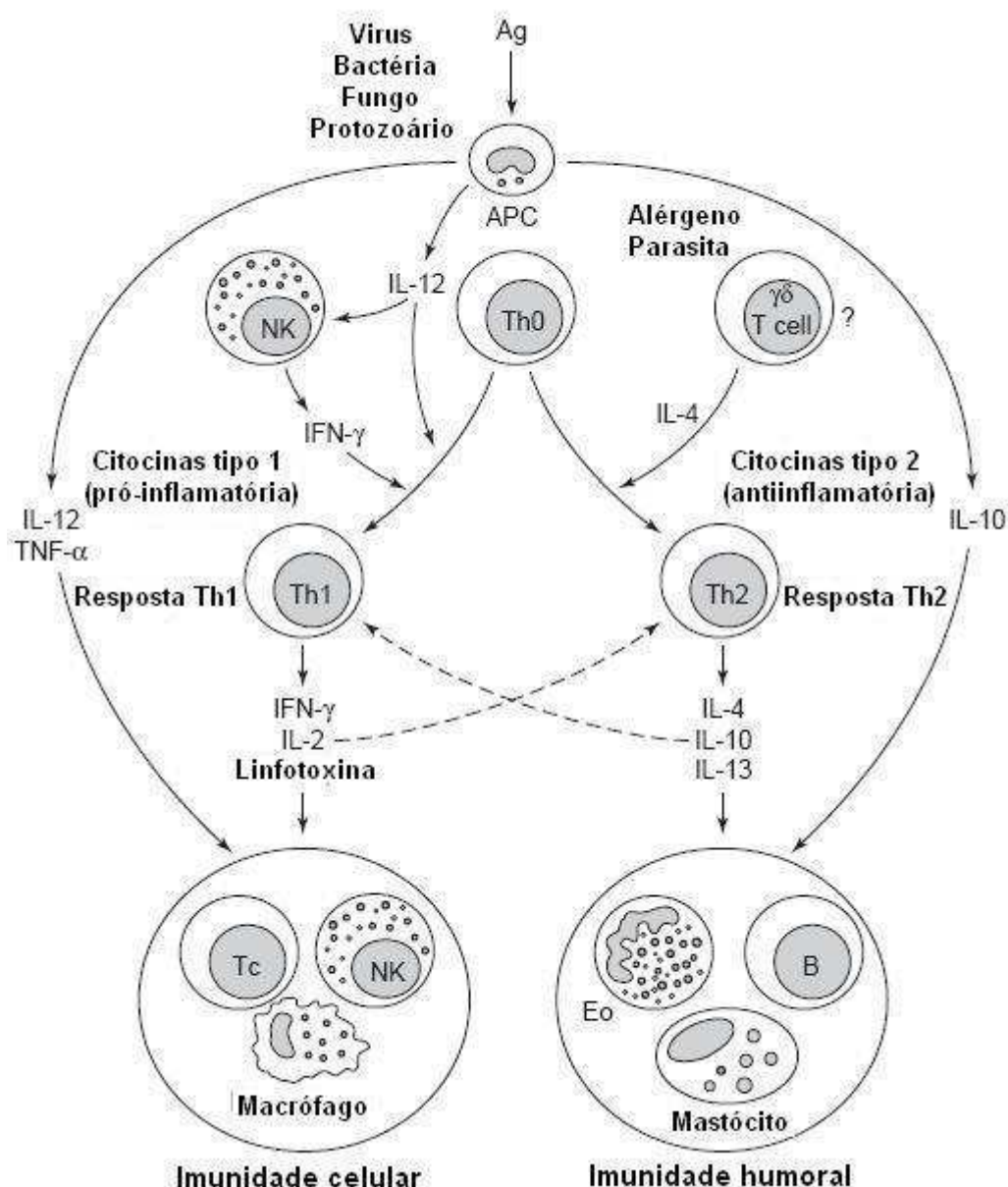


Figura 6 – Função dos linfócitos T *helper* (Th) 1 e Th2 e citocinas tipo 1 e tipo 2 na regulação da imunidade celular e humoral. Fonte: ELENKOV e CHROUSOS (1999, adaptado). Ag – antígeno. Eo – eosinófilo. APC – célula apresentadora de antígeno. NK – *natural killer* (células matadoras naturais). Tc – linfócito T citotóxico.

1.3 Diabetes Mellitus e Sistema Imunitário

Algumas funções imunitárias humorais (citocinas, proteínas do complemento) estão diminuídas, enquanto outras não se alteram em pacientes com

diabetes mellitus quando comparados a indivíduos saudáveis (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999). Distúrbios na imunidade celular parecem atrelados a maior suscetibilidade de pacientes diabéticos a infecções. A resposta quimiotática de células polimorfonucleares não se alterou após incubação com glicose ou com insulina, contudo, retornou aos valores normais após incubação concomitante com glicose e insulina (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999). A melhora na resposta quimiotática de células polimorfonucleares, após a adição dessas duas substâncias ocorreu, provavelmente, porque a maioria das funções destas células são processos dependentes de energia e a glicose necessita de insulina para adentrar estas células e gerar energia.

Animais diabéticos quando comparados a animais saudáveis apresentam aumento na liberação de leucotrieno B₄ por células polimorfonucleares sangüíneas (PARLAPIANO et al., 1999). A hiperglicemia crônica provavelmente é responsável pela maior ativação destas células, uma vez que as concentrações de leucotrieno B₄ apresentaram correlação significativa e positiva com as concentrações de hemoglobina glicada 1C (HbA_{1c}). PERNER, NIELSEN e RASK-MADSEN (2003), ao incubarem neutrófilos sangüíneos de indivíduos saudáveis na presença de 5 mM, 10 mM e 25 mM de glicose (correspondente a aproximadamente 99 mg/dL, 198 mg/dL, 495 mg/dL, respectivamente), verificaram inibição resultante de hiperglicemia da produção de ânion superóxido por estas células quando estimuladas com formil metionil leucil fenilalanina (fMLP), com redução de 50% na presença de 25 mM de glicose. Esta redução provavelmente esteja atrelada à inibição da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase, que catalisa a formação de NADPH, uma vez que este estudo verificou que a adição de um inibidor desta enzima (dehidroepiandrosterona) reduziu a produção de ânion superóxido por neutrófilos.

A longo prazo, a hiperglicemia pode acarretar formação de AGE, os quais podem influenciar a função de células imunitárias. WONG et al. (2002) verificaram que tanto após estímulo mecânico quanto químico (fMLP), complexo AGE-albumina aumentou a produção de ERO por neutrófilos sangüíneos de indivíduos saudáveis. A exposição a um inibidor do complexo enzimático NADPH oxidase (iodônio difenileno) reverteu esta alteração causada por AGE-albumina de maneira dose dependente, indicando função central da NADPH oxidase tanto na produção basal quanto aumentada por AGE de ERO por neutrófilos. Contudo, vale

ressaltar que, neste estudo, verificou-se aumento de ERO por AGE somente na presença de estímulo secundário.

NABI et al. (2005) verificaram que o diabetes induzido por estreptozotocina (65 mg/kg de peso corporal; intraperitonealmente) por sete dias resultou em menor fagocitose de partículas opsonizadas e não-opsonizadas e maior redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) por neutrófilos sangüíneos. Adicionalmente, ALBA-LOUREIRO et al. (2006) não encontraram modificações na produção de H_2O_2 na ausência de estímulo por neutrófilos peritoneais de ratos diabéticos, enquanto neutrófilos de ratos diabéticos apresentaram menor produção de H_2O_2 quando estimulados com forbol miristato acetato (PMA). Entretanto, o diabetes experimental modificou o metabolismo destas células, aumentando a atividade da enzima fosfofrutoquinase e reduzindo a de glicose 6-fosfato desidrogenase e glutaminase, sem alteração significativa de hexoquinase, isocitrato desidrogenase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD^+) bem com dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada ($NADP^+$). Diabetes também acarretou redução da descarboxilação de $[1-^{14}C]$ glicose e aumento de $[6-^{14}C]$ glicose e $[U-^{14}C]$ ácido palmítico. Estas modificações no metabolismo podem possuir uma importante função na prejudicada função de neutrófilos observada no diabetes. O tratamento com insulina *in vivo* aboliu as alterações induzidas pelo diabetes, mesmo sem alterar a glicemia destes animais, sugerindo possível efeito direto da insulina sobre o metabolismo e função de neutrófilos.

WALRAND et al. (2004) verificaram que em *clamp* hiperinsulinêmico/euglicêmico, onde foram infundidas concentrações de glicose de jejum e concentrações de insulina, que resultaram em um aumento de 3,7 vezes na insulinemia dos indivíduos, aumentou a porcentagem de neutrófilos e reduziu a porcentagem de linfócitos circulantes. Além disso, este *clamp* reduziu a expressão dos receptores CD11b, CD15, CD62L e CD89, bem como a produção de mieloperoxidase e lactoferrina por neutrófilos sangüíneos de indivíduos saudáveis, além de aumentar a migração espontânea e direcionada, fagocitose de partículas de zimosan opsonizado e produção de ERO basal e estimulada com fMLP. Vale ressaltar que neste *clamp* as concentrações de insulina foram 10 vezes superiores às de indivíduos diabéticos e três vezes superiores às de indivíduos saudáveis.

Linfócitos têm como principais fontes de energia glicose e glutamina, contudo, ratos diabéticos apresentam redução na oxidação destes substratos e

aumento na oxidação de ácidos graxos livres em linfócitos provenientes de linfonodos mesentéricos, devido à inibição da atividade de enzimas-chave para a oxidação de glicose e glutamina (OTTON; MENDONÇA; CURI, 2002). Estas alterações metabólicas foram revertidas pela administração *in vitro* e *in vivo* de insulina. Concomitantemente, linfócitos provenientes de linfonodos mesentéricos de ratos saudáveis incubados em meio contendo 20 mM de glicose (equivalente a aproximadamente 396 mg/dL) apresentaram reduzida resposta proliferativa alcançando valores similares aos de ratos diabéticos. Além disso, OTTON et al. (2002) verificaram diminuída proliferação de linfócitos de ratos diabéticos após estímulo com Con A, LPS ou insulina em relação ao grupo controle. Isto foi correlacionado à reduzida fosforilação intracelular de substrato do receptor de insulina (IRS) 1 e proteína adaptadora de ligação a fosfotirosina contendo domínio 2 homólogo a Src (SH2) (Shc) nos linfócitos destes animais. Adicionalmente à menor proliferação celular, o diabetes conduz a um aumento na apoptose de linfócitos. OTTON et al. (2004) verificaram maior fragmentação de DNA de linfócitos estimulados com os mitógenos Con A e LPS, condensação de cromatina e expressão de genes pró-apoptóticos (bcl-xS, c-myc e p53) e diminuída expressão de genes anti-apoptóticos (bcl-2) em ratos diabetizados com aloxana, bem como em pacientes diabéticos.

1.4 Diabetes Mellitus e Treinamento com Pesos

Indivíduos diabéticos, mesmo submetidos a tratamento com insulina, apresentam risco aumentado de aterosclerose, devido à dose acumulativa de insulina exógena (MUIS et al., 2005a). Portanto, intervenções capazes de mimetizar alguns efeitos da insulina, reduzindo sua necessidade exógena, são relevantes no tratamento de indivíduos diabéticos. Nesse sentido, a contração muscular pode aumentar a captação de glicose pela translocação de proteínas transportadoras de glicose (GLUT) 4 contidas em vesículas intracelulares para a membrana plasmática por vias distintas das desencadeadas pela ação da insulina (GOODYEAR; KAHN, 1998; JESSEN; GOODYEAR, 2005; RITCHER et al, 2004; RYDER; CHIBALIN; ZIERATH, 2001).

A insulina aumenta o transporte de glicose nas células adiposas e musculares estimulando a translocação de vesículas contendo GLUT4 de

compartimentos intracelulares para a membrana plasmática e regulando a fusão desta vesícula com a membrana (SALTIEL; KAHN, 2001). A cascata de eventos de transdução de sinais envolvidos na ação da insulina (Figura 7) é ativada pela ligação de uma única molécula de insulina a subunidade α de seu receptor, desencadeando a autofosforilação de resíduos de tirosina da subunidade β , que catalisam a fosforilação de membros da família IRS1 e 2 (RYDER; CHIBALIN; ZIERATH, 2001). IRS1 age como plataforma para proteínas com domínio SH2, incluindo a duplo-funcional quinase lipídica/serina proteína quinase, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), a proteína ligadora 2 do receptor de fator de crescimento (Grb2) e a proteína tirosina fosfatase contendo SH2 (SHP2). A ativação de PI3-K produz segundos mensageiros que estimulam proteínas, incluindo a serina/treonina proteína quinase conhecida como Akt (ou proteína quinase B), e o subgrupo atípico da PKC, ζ e λ . A via da PI3-K estimula a translocação de transportadores de glicose para a membrana plasmática tanto por meio de Akt quanto PKC atípica (SALTIEL; KAHN, 2001). A sinalização através de Grb2 e SHP2 ativa a proteína ligadora de guanosina trifosfato (GTP), Ras, que por sua vez, estimula a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), levando ao crescimento e diferenciação celular. O resultado fisiológico de muitos mecanismos acima citados é uma mudança rápida do metabolismo no citoplasma e na mitocôndria, causada pela ativação ou desativação por fosforilação ou desfosforilação de enzimas críticas (KIRWAN; AGUILA, 2003).

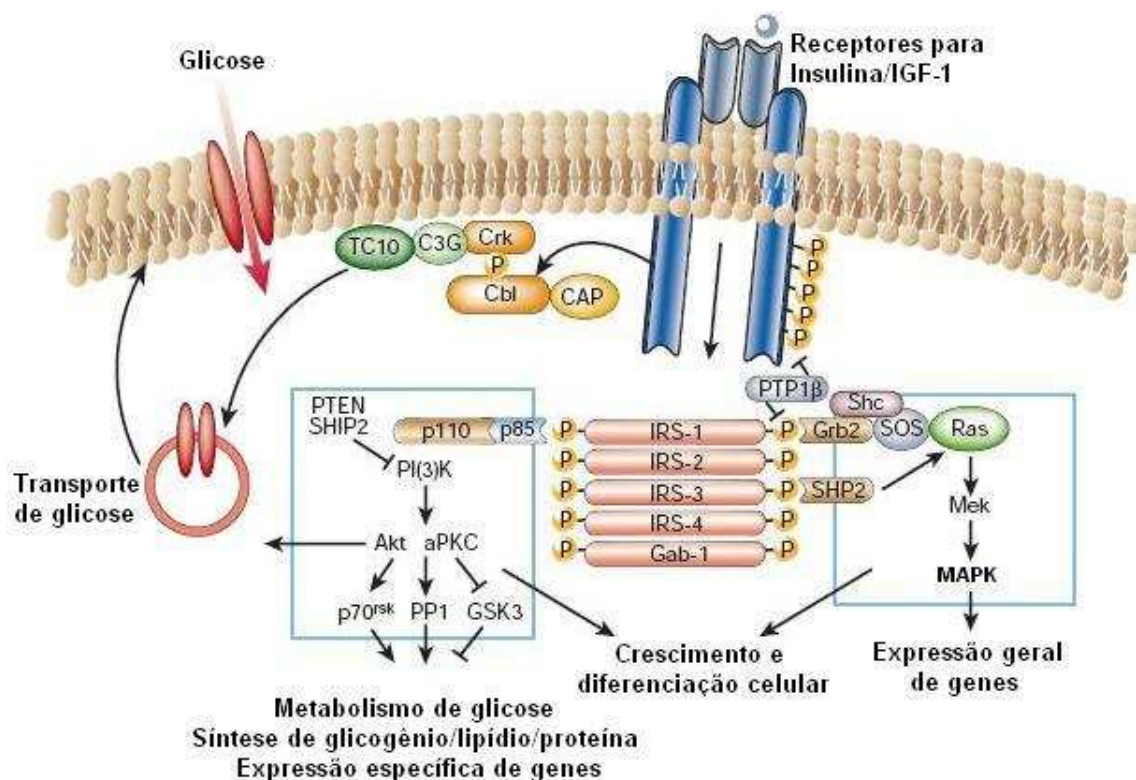


Figura 7 – Sinalização intracelular pela insulina. Fonte: SALTIEL e KAHN (2001, adaptado).

Enquanto o transporte de glicose estimulado pela insulina é dependente da ativação da enzima PI3-K, o mecanismo de sinalização utilizado pela contração muscular, apesar de ainda não precisamente identificado, independe da ação desta enzima. A sinalização pela contração muscular, que desencadeia o aumento na translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, parece envolver dois níveis: cálcio intracelular e a condição energética do músculo (RICHTER et al., 2004) (Figura 8).

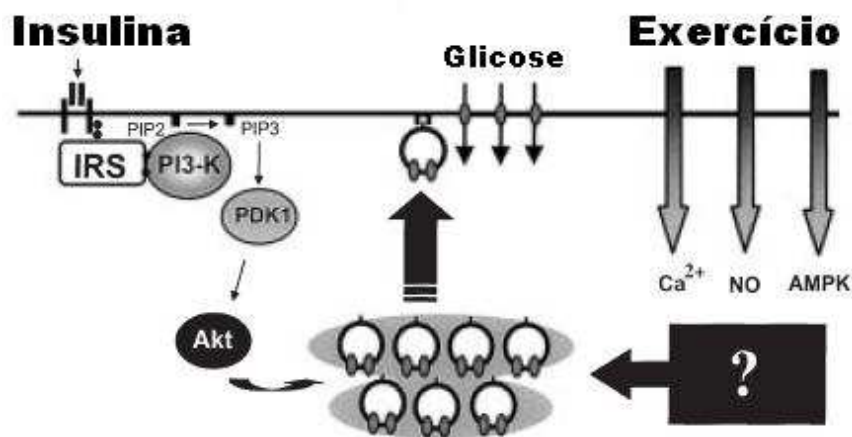


Figura 8 – Transdução de sinais pela insulina e pelo exercício. Tanto a insulina quanto o exercício físico estimulam transporte de glicose no músculo esquelético aumentando a translocação de GLUT4. Transporte de glicose estimulado por insulina é dependente da ativação de PI3-K, enquanto que o transporte de glicose estimulado pelo exercício independe desta enzima e pode envolver cálcio citosólico (Ca²⁺), óxido nítrico (NO) e/ou adenosina monofosfato quinase (AMPK). Fonte: RYDER, CHIBALIN e ZIERATH (2001, adaptado).

Cálcio intracelular pode iniciar ou facilitar a ativação de moléculas de sinalização intracelular ou cascatas de proteínas de sinalização conduzindo a efeitos imediatos ou prolongados do exercício físico sobre o transporte de glicose no músculo esquelético (GOODYEAR; KAHN, 1998). PKC é um exemplo de intermediário da sinalização dependente de cálcio que é ativado pela contração muscular e, portanto, pode estar envolvido na regulação do transporte de glicose estimulado pelo exercício físico (JESSEN; GOODYEAR, 2005; RICHTER et al., 2004). O transporte de glicose estimulado por contração muscular também pode ser regulado por sinais de *feedback* relacionados à condição metabólica do músculo. A enzima 5' adenosina monofosfato (AMP) quinase (AMPK) é creditada ser a quinase que regula o transporte de glicose durante estresse celular, tais como contração muscular intensa, uma vez que é ativada por diminuição na relação creatina fosfato/creatina e adenosina trifosfato (ATP)/AMP, ou quando o conteúdo de glicogênio está baixo (JESSEN; GOODYEAR, 2005; RICHTER et al., 2004; RYDER; CHIBALIN; ZIERATH, 2001). Portanto, o exercício físico pode aumentar a captação

de glicose pelas células, mesmo em condições hipoinsulinêmicas, podendo auxiliar no controle glicêmico de pacientes diabéticos.

Exercício com pesos de alta intensidade é recomendado para indivíduos diabéticos tipo 1 jovens, mas não para indivíduos adultos ou diabéticos há muito tempo. Programas de treinamento com pesos de intensidade moderada, utilizando cargas leves e elevado número de repetições, podem ser executados visando manter ou aumentar a força de membros superiores em quase todos pacientes com diabetes. Todos os níveis de atividade física podem ser realizados por pessoas com diabetes tipo 1, sem complicações e que estejam em bom controle glicêmico (ZINMAN et al., 2004), se as respostas contra-regulatórias estiverem intactas, é improvável que o exercício físico cause notável hipoglicemia nestes indivíduos. Contudo, hipoglicemia no dia anterior ao exercício físico aumenta a probabilidade de hipoglicemia durante sua prática (GALASSETTI et al., 2003). Hipoglicemia, que pode ocorrer durante, imediatamente após ou muitas horas após atividade física, pode ser evitada, desde que o paciente possua um conhecimento adequado das respostas metabólicas e hormonais ao exercício físico e os ajustes apropriados na dose de insulina necessários para diferentes modalidades (ZINMAN et al., 2004). Se indivíduos diabéticos iniciam a prática de exercício físico com hipoinsulinemia devido à inadequada terapia, liberação excessiva de hormônios contra-regulatórios durante o exercício físico pode aumentar as concentrações, já elevadas, de glicose e corpos cetônicos, podendo precipitar cetoacidose diabética. Em contrapartida, hiperinsulinemia decorrente da administração de insulina exógena, pode atenuar ou até mesmo prevenir o aumento na mobilização de glicose e outros substratos induzido pelo exercício físico, podendo acarretar hipoglicemia (ZINMAN et al., 2004). Portanto, a falta de controle no diabetes tipo 1 é a principal preocupação em relação à exposição destes indivíduos à prática de exercícios físicos.

Devido à utilização inadequada da glicose no diabetes, há intensa degradação protéica para produção de energia. Esta degradação, conjuntamente com a deficiência em sintetizar ácidos graxos a partir de carboidratos e aminoácidos, e o aumento na oxidação de lipídios, conduz à redução na massa corporal. No diabetes mellitus, há redução na síntese protéica (FARRELL et al., 1999a; FEDELE et al., 2000; KOSTYAK et al., 2001), além de degradação protéica aumentada pela via ubiquitina-proteossomo (LECKER et al., 1999; LIU et al., 2000). Redução de

aproximadamente 17% da massa corporal de ratos diabéticos foi verificada três dias após indução com estreptozotocina, concomitantemente a uma redução de cerca de 19% do peso do músculo epitroclear e degradação protéica aumentada via o sistema ubiquitina-proteossomo no músculo incubado (LECKER et al., 1999). Considerando que o treinamento de força conduz a hipertrofia muscular, além de atenuar a perda de massa muscular associada a uma variedade de condições hipercatabólicas, indivíduos diabéticos podem ser beneficiados pela sua prática regular. Nesse sentido, estudos demonstraram que tanto sessões agudas de exercício com pesos (FARRELL et al., 1999b) quanto um período de treinamento físico regular (FARRELL et al., 1999a) podem elevar as taxas de síntese protéica no músculo esquelético de ratos saudáveis, bem como de ratos moderadamente diabéticos.

1.5 Treinamento com Pesos e Sistema Imunitário

Uma sessão de exercício físico causa alterações temporárias conhecidas como resposta aguda ao exercício. No caso do sistema imunitário, o exercício físico agudo causa leucocitose, principalmente pelo aumento de linfócitos e neutrófilos e em menor magnitude de monócitos. SIMONSON e JACKSON (2004) encontraram aumento de leucócitos totais, monócitos, neutrófilos e linfócitos sangüíneos imediatamente após submeterem mulheres a três séries de 8-10 repetições a 75% de uma repetição máxima (RM) (1-RM) em oito exercícios com pesos. Estes parâmetros diminuíram após 15 min, retornando aos valores pré-exercício em 30 min, exceto para neutrófilos. Os autores atribuíram estas alterações à redução significativa no volume plasmático (aproximadamente 8,9%) verificada após o exercício com retorno aos valores iniciais após 15 min. A neutrofilia verificada logo após o exercício físico provavelmente decorra da demarginação destas células provocada por alterações hemodinâmicas associadas à ação de catecolaminas, que também são responsáveis pela monocitose e aumento de células NK decorrentes do exercício físico agudo.

DOHI et al. (2001) avaliaram a resposta das subpopulações de linfócitos do sangue a seis séries de 10 RM no agachamento com dois minutos de intervalo. Para tanto, 50 mulheres foram avaliadas em teste de 1-RM e as oito com maior força e as oito com menor força foram utilizadas como grupos experimentais.

Tanto o grupo com maior quanto menor força apresentaram aumento de linfócitos T (aproximadamente 53% e 41%, respectivamente) e de células NK (aproximadamente 152% e 200%, respectivamente), enquanto somente o grupo com maior força apresentou aumento de linfócitos B (aproximadamente 58%). No entanto, a proliferação de linfócitos T estimulada por Con A ou PHA não se modificou frente à sessão de exercícios com pesos em ambos os grupos. Contudo, poucos estudos tentaram analisar o efeito de um programa de treinamento físico regular sobre a resposta imunitária. A maioria destes utilizaram delineamentos transversais, o que dificulta a análise, uma vez que o nível de aptidão física inicial dos indivíduos tende a variar amplamente.

OLIVEIRA, ROGATTO e LUCIANO (2002), submetendo ratos diabéticos a cinco sessões semanais de quatro séries de 10 saltos em tanque com água com um minuto de intervalo durante seis semanas, não encontraram modificações na glicemia e insulinemia, tampouco no número de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos tanto de ratos controle quanto diabéticos. O treinamento físico somente aumentou o número de monócitos (aproximadamente 150,0%) no grupo controle, e estes valores aumentados não diferiram dos grupos diabético e diabético-treinado. Apesar da característica anaeróbia do protocolo, a combinação de duração, frequência e intensidade proposta por estes autores talvez foi insuficiente para modificar a contagem diferencial de leucócitos. No entanto, a funcionalidade destas células talvez se modificou pelo treinamento, contudo, este parâmetro não foi analisado por este estudo. MILES et al. (2002) não verificaram alterações na contagem diferencial de leucócitos bem como a proliferação de linfócitos em repouso após submeterem mulheres não-treinadas a seis meses de treinamento com pesos tanto utilizando protocolo para força e potência quanto protocolo para hipertrofia (MILES et al., 2002). Adicionalmente, MILES et al. (2003) verificaram que seis meses de treinamento com pesos não foram capazes de modificar o aumento na contagem diferencial de leucócitos após seis séries de 10 RM a 75% de 1-RM no agachamento em mulheres previamente não-treinadas. Quando analisadas subpopulações linfocitárias, o aumento de linfócitos T CD3-CD8⁺, T CD3-CD4⁺ e B após uma sessão de exercício físico foi maior (aproximadamente 106%, 41% e 37,5%, respectivamente) após três meses de treinamento. A proliferação de linfócitos diminuiu após exercício agudo em todas as medidas, sendo a magnitude desta redução similar em todos os momentos quando

linfócitos foram estimulados com Con A (estimulador de linfócitos T), e mais acentuada quando estimulados com o mitógeno *pokeweed* (estimulador de linfócitos B). A inibição da proliferação linfocitária provavelmente resulte, sobretudo, da ação da epinefrina e do cortisol que se elevam em consequência do exercício físico. Ainda visando analisar a funcionalidade de leucócitos, NUNES (2005) submeteram ratos Wistar a quatro sessões semanais de 10 séries de 30 s de saltos com um minuto de intervalo durante oito semanas. O treinamento de saltos aumentou a capacidade fagocítica, volume lisossomal, produção de H_2O_2 e ânion superóxido tanto por células polimorfonucleares sangüíneas (aproximadamente 186,5%, 91,7%, 12,3% e 15,0%, respectivamente) quanto por macrófagos peritoneais (aproximadamente 9,9%, 19,0%, 11,0% e 34,1%, respectivamente).

2 JUSTIFICATIVA

O diabetes mellitus tipo 1 é uma doença auto-imune, que provoca destruição das células β pancreáticas e ao longo dos anos conduz a diversas complicações micro e macrovasculares, associando-se a elevado risco de morbidade e mortalidade. A qualidade de vida do indivíduo diabético é progressivamente reduzida devido ao elevado catabolismo, bem como depressão do sistema imunitário. Verifica-se na literatura redução na síntese e aumento na degradação protéica em animais diabéticos (LECKER et al., 1999; LIU et al., 2000; FARRELL et al., 1999a), que, conjuntamente com o menor armazenamento de glicogênio e lipídios, conduzem à redução na massa corporal destes animais. A diminuição na produção de insulina no diabetes mellitus também reduz o estímulo para a captação de glicose pelas células musculares e adiposas, resultando em hiperglicemia e hiperlipidemia. Estas alterações acarretadas pelo diabetes mellitus podem afetar a funcionalidade de células do sistema imunitário (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999), tornando indivíduos diabéticos mais suscetíveis a infecções devido a distúrbios na imunidade inata e celular (PELEG et al., 2007). O diabetes mellitus tanto em humanos quanto em modelos experimentais modifica o número de leucócitos circulantes (MIRANDA, 2005; RUIZ et al., 2007; SYBIRNA et al., 2006), bem como a funcionalidade de neutrófilos (ALBA-LOUREIRO et al., 2006; KARIMA et al., 2005; NABI et al., 2005) e resposta proliferativa de linfócitos (BATISTA, 2006; OTTON, 2001; SAKOWICZ-BURKIEWICZ et al., 2006).

O treinamento físico, sobretudo em modelos predominantemente anaeróbios que ativam mais especificamente vias anabólicas, pode auxiliar na reversão deste quadro. O exercício físico aumenta a captação de glicose pelas células por vias distintas das desencadeadas pela ação da insulina (GOODYEAR; KAHN, 1998; JESSEN; GOODYEAR, 2005; RICHTER et al., 2004; RYDER; CHIBALIN; ZIERATH, 2001), estimulando a captação de glicose, mesmo em condições hipoinsulinêmicas, podendo auxiliar no controle glicêmico de pacientes diabéticos e reduzir a necessidade diária de insulina exógena. Na literatura, advoga-se que a relação entre o sistema imunitário e o exercício físico apresenta estreita relação com a intensidade na qual este é praticado. Um período de treinamento físico crônico, com intensidades controladas no sentido de permitir a recuperação de todos os sistemas energéticos, não altera o número de leucócitos circulantes tanto

em indivíduos saudáveis, atletas ou em modelo animal (KILGORE et al., 2002; MILES et al., 2002; MILES et al., 2003; OLIVEIRA; ROGATTO; LUCIANO, 2002). Mesmo não alterando cronicamente o número de leucócitos circulantes, o treinamento físico é capaz de modificar a funcionalidade destas células. Neste sentido, a capacidade fagocítica e citotóxica de neutrófilos é alterada tanto em modelo animal (LEVADA-PIRES et al., 2007; NUNES, 2005) quanto em seres humanos (ORTEGA, 2003; ORTEGA et al., 2005) após um período de treinamento físico. Por outro lado, estudos demonstraram que o treinamento físico não altera a resposta proliferativa de linfócitos T e B (LEANDRO et al., 2006; MILES et al., 2002) ou, dependendo do modelo empregado, pode aumentar a proliferação destas células (CUNHA et al., 2004; KWAK, 2006).

OLIVEIRA, ROGATTO e LUCIANO (2002), aplicando um treinamento de alta intensidade caracterizado por protocolo de saltos, não verificaram modificações no número de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos, bem como leucócitos totais no sangue de ratos diabéticos. Apesar disso, talvez a funcionalidade destas células modificaram-se com o treinamento, contudo, este parâmetro não foi analisado por este estudo. Fundamentado nos estudos prévios fica evidente que maiores esclarecimentos são necessários sobre o efeito do treinamento físico, predominantemente anaeróbio, como intervenção visando otimizar a funcionalidade de leucócitos de indivíduos diabéticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito do treinamento anaeróbio de saltos sobre parâmetros bioquímicos sangüíneos e a funcionalidade de neutrófilos sangüíneos e linfócitos mesentéricos de ratos diabéticos.

3.2 Objetivos Específicos

Verificar o efeito do treinamento de saltos sobre os seguintes parâmetros de ratos diabéticos:

- Peso corporal e consumo alimentar e hídrico;
- Concentrações plasmáticas de glicose, lactato, triacilglicerol (TAG) e colesterol total;
- Contagem diferencial de leucócitos sangüíneos;
- Capacidade fagocítica e produção de ânion superóxido por neutrófilos sangüíneos;
- Proliferação de linfócitos estimulados com Con A ou LPS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

Este estudo possui delineamento do tipo experimental. Para cada experimento, 20 ratos foram proporcionalmente divididos em quatro grupos: controle, treinado, diabético e diabético-treinado. A distribuição foi intencional de modo a se obter grupos homogêneos quanto ao peso corporal, utilizando-se uma distribuição por blocos. Cinco experimentos foram realizados, cada um proveniente de animais diferentes e, iniciando, com cinco ratos por grupo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com, no máximo, cinco ratos por gaiola. A taxa de mortalidade total da amostra foi de 13%, o que resultou em 23, 22, 22 e 20 animais nos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado, respectivamente.

Neste projeto, o treinamento de saltos e o diabetes experimental são considerados como variáveis independentes e as variáveis dependentes analisadas foram: peso corporal, consumo alimentar e hídrico, glicemia, lactatemia, triacilglicerolemia, colesterolemia, capacidade fagocítica e produção de ânion superóxido por neutrófilos sangüíneos e proliferação de linfócitos mesentéricos. As variáveis de controle são sexo (machos) e idade (aproximadamente 60 dias).

4.2 Amostra

Ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus albinus*) com aproximadamente 60 dias de idade foram obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas, Campus Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, mantidos em sala com ciclo de claro/escuro (22 h/10 h) e temperatura constante ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Durante o período experimental, os animais receberam ração (Nuvital CR-1, Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, PR, BRA, composta por 66% de carboidratos, 23% de proteínas, 4% de lipídios, 6% de fibras e 1% de vitaminas e minerais (PIZATO et al., 2005)) e água à vontade. A quantidade de ração e volume de água consumidos foram mensurados diariamente aproximadamente no mesmo horário.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná (Anexo).

4.3 Indução do Diabetes Experimental

Os ratos dos grupos a serem diabetizados permaneceram em jejum por no mínimo 12 h e, após sedação com éter, administrou-se i. v. 60 mg de estreptozotocina (2-desoxi-2-(3-metil-3-nitrosoamina)-D-glicopiranosose) por kg de peso corporal dissolvida em tampão citrato (ácido cítrico 18,2 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29,6 mM; pH 4,8). Após a injeção, os ratos foram mantidos por uma hora adicional sem ração, evitando a competição existente entre a glicose e a estreptozotocina pelo transportador GLUT2 na célula β pancreática (SZKUDELSKI, 2001). Os animais dos grupos controle e treinado receberam tratamento similar, contudo, com a administração somente do veículo. A comprovação do diabetes experimental foi realizada 48 h após a administração da droga, através da determinação da concentração sérica de glicose proveniente de sangue coletado da cauda do rato, após um período mínimo de jejum de 12 h, utilizando-se os procedimentos descritos posteriormente para concentrações plasmáticas. Os animais foram considerados diabéticos com glicemia igual ou superior a 250 mg/dL.

4.4 Protocolo de Treinamento de Saltos

O protocolo de treinamento de saltos empregado baseia-se no modelo proposto por ROGATTO (2001). Após um período de adaptação ao meio líquido (uma hora de natação por dia durante dois dias consecutivos sem utilização de sobrecarga) iniciado no dia seguinte à dosagem da glicemia, os animais dos grupos treinado e diabético-treinado foram submetidos a seis semanas de treinamento de saltos com quatro sessões semanais (segundas, terças, quintas e sextas-feiras), resultando em 24 sessões de treinamento. Os ratos realizaram saltos em tanque com água (Figura 9), com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal de cada animal, acoplado ao tórax com auxílio de um colete (com aumento progressivo: 30% na primeira semana, 40% na segunda semana e 50% a partir da terceira semana até o final do período experimental). A carga foi ajustada antes de

cada sessão de treinamento, que consistiu de seis séries de 10 saltos com um minuto de intervalo entre as séries. A contagem das repetições ocorreu cada vez que o animal se projetou em direção à superfície da água para respirar. Os ratos não-treinados foram submetidos às mesmas condições de deslocamento que os ratos treinados. A temperatura da água foi mantida entre 29 e 32°C. Os saltos foram realizados em tubo de PVC com 250 mm de diâmetro, visando limitar a alternativa do animal em seguir para outra direção, favorecendo dessa forma o salto. A profundidade da água correspondia a aproximadamente 150% do comprimento corporal do rato.



Figura 9 – Sistema de natação utilizado para o treinamento de saltos composto por tanques com água.

Na penúltima sessão de treinamento, concentração sérica de lactato foi mensurada por meio de um lactímetro Accusport®; o sangue foi coletado pela cauda em três experimentos diferentes logo após a sexta série de saltos.

4.5 Instrumentos

4.5.1 Enzimas e reagentes

Todos os componentes dos tampões foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira S/A (Rio de Janeiro, RJ, BRA), Vetec Química Fina

Ltda (Rio de Janeiro, RJ, BRA) ou Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (Diadema, SP, BRA). Acetato de cálcio, ácido cítrico, ácido tetra acético de etilenodiamina (EDTA), azul de tripan, Con A, estreptozotocina, hidrato de hidrazina, L-glutamina, L-lactato desidrogenase, LPS, β -NAD⁺, NBT, tris base, vermelho neutro e zimosan foram provenientes da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). Meio de cultura (RPMI 1640), antibióticos (penicilina G e estreptomina) e soro fetal bovino foram obtidos da Gibco (Grand Island, NY, USA), enquanto que o Ficoll-Paque™ PLUS e o líquido de cintilação, da Amersham Biosciences (USA). Os corantes Giemsa e May Grünwald foram provenientes da Newprov Produtos para Laboratório (Pinhais, PR, BRA). O material radioativo ([2-¹⁴C]-timidina; 50 mCi/mmol) foi obtido da New England Nuclear Research Products (Du Pont Company, Biotechnology Systems, USA). Kits da linha Bioliquid (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais, PR, BRA) foram utilizados para análises bioquímicas.

4.5.2 Equipamentos para análises

Durante o experimento, os animais foram pesados diariamente no período da manhã, sempre no horário anterior ao treinamento, com utilização de uma balança da marca Urano com precisão de 1 grama. Leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech, GBR), exceto quando os procedimentos foram realizados em microplacas de 96 poços, neste caso, a leitura foi realizada em leitor de microplacas da marca Bench Mark (Biorad Laboratories, GBR). Os procedimentos de centrifugação foram realizados em centrífuga Eppendorf modelo 5810R (GER). Os reagentes foram pesados em uma balança analítica da marca Denver (AA-200, Denver Instrument Company, USA) com precisão de 0,1 mg. Emissão de radioatividade foi quantificada por contador Beckman LS 6000 (USA). Coletor múltiplo Skatron Combi Multiple Cell Harvester (Skatron Combi, GBR) foi utilizado para coletar os linfócitos. A contagem de células foi realizada em um microscópio Nikon YS100 (Nikon Corporation, JPN).

4.6 Ortotanásia dos Animais

Ao término das seis semanas experimentais, os animais foram ortotanasados entre oito e 10 h por decapitação com auxílio de guilhotina após

jejum mínimo de 12 h, 48 h após a última sessão de treinamento, visando descartar o efeito agudo desta sessão sobre as variáveis analisadas. Este método foi utilizado para facilitar a retirada de grande volume de sangue necessário para as análises plasmáticas e isolamento de neutrófilos sangüíneos. O sangue foi coletado em tubos contendo 10% volume (v)/v de EDTA (1% peso (p)/v), centrifugado a 1.200 rpm a 4°C por 10 min. Em seguida, o plasma foi separado e em tubos eppendorfes para análise plasmática de glicose, lactato, triacilglicerol (TAG) e colesterol total. Uma gota do sangue total do rato foi aplicada sobre uma lâmina (em duplicata) e, em seguida, realizou-se o esfregaço da amostra, deixando secar a temperatura ambiente para posterior coloração e contagem. Adicionalmente, foram retirados os linfonodos mesentéricos, os quais foram mantidos em tubos tipo falcon contendo solução salina tamponada com sais de fosfato (PBS) (NaCl 0,8% p/v; KCl 0,02% p/v; KH_2PO_4 0,012% p/v; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,229% p/v; pH 7,4).

4.7 Parâmetros Bioquímicos

4.7.1 Mensuração plasmática de glicose

A concentração plasmática de glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico glicose oxidase, utilizando um kit de glicose Bioliquid, conforme especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm e os resultados foram expressos em mg/dL.

4.7.2 Mensuração plasmática de lipídios

As concentrações plasmáticas de TAG e colesterol total foram determinadas por método enzimático colorimétrico, utilizando os kits triglicérides GPO-Trinder e colesterol total Bioliquid, respectivamente, conforme especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm e os resultados foram expressos em mg/dL.

4.7.3 Mensuração plasmática de lactato

O lactato plasmático foi determinado pelo método enzimático proposto por ENGEL e JONES (1978). Inicialmente, foi realizada a desproteinização do plasma, adicionando-se 0,05 mL de ácido tricloroacético (TCA 25% p/v) a 0,5 mL de plasma. A mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 13.000 rpm por três minutos em tubos eppendorfes. Em seguida, coletou-se 0,25 mL do sobrenadante e adicionou-se 0,004 mL de indicador universal (BDH Chemicals, GBR). Tris/KOH (0,5 M/2 M) foi acrescentado para ajuste do pH em 7,0 sinalizado pela coloração verde. Em seguida, 0,1 mL do plasma neutralizado foi pipetado em tubos contendo 1 mL de tampão de ensaio, contendo EDTA (9,58 mM), glicina (0,37 mM), hidrato de hidrazina (0,30 M), β -NAD⁺ (0,90 mM) e L-lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27) (4 unidades internacionais (UI)/mL), com pH ajustado em 8,85. Após 45 min em temperatura ambiente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 340 nm. O princípio deste ensaio consiste na conversão de lactato a piruvato pela ação da enzima lactato desidrogenase, consumindo β -NAD⁺ com formação estequiométrica de β -nicotinamida dinucleotídeo reduzida (NADH), a qual pode ser monitorada espectrofotometricamente, fornecendo a concentração de lactato existente na amostra. A partir da absorbância (abs.) da amostra, a concentração plasmática de lactato [Lactato] (mmol/L) foi calculada pela equação:

$$[\text{Lactato}] = \frac{\text{abs.}}{6,22} \times \frac{V_1}{V} \times \frac{V_2}{V_3} \times \frac{V_4}{V_5}$$

Sendo:

6,22 = constante.

V = volume de plasma (μ L).

V₁ = volume de plasma + tampão de ensaio (μ L).

V₂ = volume de plasma com proteínas + TCA (μ L).

V₃ = volume de plasma com proteínas (μ L).

V₄ = volume de plasma desproteinizado + volume de neutralização (μ L).

V₅ = volume de plasma desproteinizado (μ L).

4.8 Contagem Diferencial de Leucócitos Sangüíneos

As lâminas com esfregaço de sangue secas foram coradas pela técnica May-Grünwald-Giemsa. A lâmina foi preenchida por completo com auxílio de

uma pipeta Pasteur com May-Grünwald por oito minutos. Em seguida, aproximadamente 1 mL de água destilada foi adicionado para dissolver o corante e, após um minuto, o corante foi descartado. A lâmina foi coberta com Giemsa (10% v/v) por 15 min, novamente o corante foi descartado e a lâmina lavada suavemente em água corrente para retirada do excesso do corante. A lâmina permaneceu em temperatura ambiente para secagem e então foi devidamente armazenada para posterior contagem diferencial de leucócitos em microscópio óptico com aumento de 400 vezes (SILVA; HASHIMOTO, 2003).

4.9 Contagem de Células

A contagem total de células (número de células por mL) foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico, utilizando-se uma suspensão de células diluída duas vezes em azul de tripan (0,1% p/v). As células que se coraram em azul foram consideradas inviáveis, enquanto as brilhantes e refringentes a luz, viáveis.

4.10 Isolamento de Neutrófilos Sangüíneos

O isolamento de neutrófilos foi realizado conforme proposto por BØYUM (1976). O sangue dos animais foi coletado em tubos tipo falcon contendo anticoagulante (EDTA) e mantido sob refrigeração. Posteriormente, o sangue foi centrifugado no próprio tubo a 1.200 rpm a 4°C por 10 min. O plasma foi separado e o restante do sangue, transferido para tubo tipo falcon de 50 mL, acrescentando-se o mesmo volume em PBS. Em tubos contendo 3 mL de Ficoll-Paque PLUS foi acrescentado 8 mL do sangue diluído em PBS. Os tubos foram centrifugados a 1.400 rpm a 18°C durante 40 min. A camada superior transparente composta por células mononucleares e plaquetas foi desprezada.

A camada inferior constituída por hemácias e células polimorfonucleares foi transferida para outro tubo. Submeteu-se a amostra, duas vezes, à lise hipotônica por incubação com solução hemolítica (Tris base (tris[hidroximetil]aminometano) 17,0 mM; NH₄Cl 18,7 mM) em banho-maria a 37°C por 15 min. A solução foi centrifugada a 1.200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células, ressuspendidas em PBS e contadas em câmara de

Neubauer (descrito anteriormente). Depois de isoladas, as células polimorfonucleares, representadas em sua maioria por neutrófilos, foram submetidas aos protocolos descritos posteriormente.

4.11 Ensaaios com Neutrófilos

4.11.1 Soluções

O fixador utilizado foi o Baker formol-cálcio (formaldeído 4% v/v; cloreto de sódio 2% p/v; acetato de cálcio 1% p/v). A solução de extração consistiu de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. A solução estoque de corante vermelho neutro foi preparada pela dissolução de 0,02 g de corante em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), ao passo que a solução para uso de rotina para o ensaio de capacidade fagocítica foi preparada pela diluição de 0,3 mL da solução estoque e 0,02 g de zimosan não-opsonizado ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) em 3 mL de PBS.

4.11.2 Capacidade fagocítica

Foi utilizado o método descrito por BONATTO et al. (2004). 100 μ L de uma solução contendo 2×10^6 células por mL foram depositados em microplaca de 96 poços. Adicionou-se 0,01 mL de solução contendo zimosan não-opsonizado ($1,0 \times 10^8$ partículas/mL) corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 min a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 0,1 mL de fixador Baker para interromper o processo de fagocitose. Após 30 min, a microplaca foi lavada com PBS, visando remover as partículas de zimosan coradas não-fagocitadas pelos neutrófilos. O vermelho neutro incorporado dentro dos fagossomos foi solubilizado, utilizando-se 0,1 mL de solução de extração e, após 30 min, procedeu-se a leitura da absorbância a 550 nm e os dados foram expressos em absorbância/ 2×10^5 células.

4.11.3 Produção de ânion superóxido

A produção de ânion superóxido foi mensurada pela redução de NBT, um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e com coloração azul no seu estado reduzido (MADHAVI; DAS, 1994). Alíquotas de 0,1 mL de solução contendo 2×10^6 células por mL foram colocadas em poços e, em seguida, adicionou-se 0,1 mL NBT (0,25% p/v), onde permaneceram incubados por 30 min a 37°C. A microplaca foi centrifugada a 1.200 rpm por cinco minutos, lavada com PBS e as células fixadas com metanol (50% v/v). Após incubação de 10 min, a microplaca foi centrifugada novamente e o sobrenadante descartado. O NBT reduzido, presente no sedimento, foi solubilizado em 0,12 mL de KOH 2 M e 0,14 mL de DMSO. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 550 nm e os dados foram expressos em absorbância/ 2×10^5 células.

4.12 Obtenção de Linfócitos Mesentéricos

Os linfonodos mesentéricos foram retirados, colocados em PBS e dissecados. Os linfócitos foram obtidos por compressão destes órgãos em peneiras de malha fina. Posteriormente, a solução de células foi filtrada em papel filtro especial (Whatman nº 105) e centrifugadas a 1.200 rpm a 4°C por oito minutos. O sobrenadante foi descartado e lavagem adicional foi realizada, contudo, com PBS estéril. A suspensão foi novamente centrifugada e submetida à contagem de células.

4.13 Proliferação de Linfócitos

Uma vez isolados os linfócitos, 2×10^6 células por mL foram cultivadas em microplacas de 96 poços (volume final de 0,18 mL) a 37°C em atmosfera de 95% ar/5% CO₂ por 48 h em meio de cultura RPMI 1640 (1% p/v) suplementado com L-glutamina (13,5 mM) e NaHCO₃ (26,2 mM) e enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 0,1% (v/v) de antibióticos (penicilina G 10 mU e estreptomicina 10 mg/L). Os linfócitos foram estimulados com 0,02 mL por poço de solução dos mitógenos Con A (5 µg/mL), estimulador da proliferação de linfócitos T (LICASTRO; DAVIS; MORINI, 1993), ou LPS (10 µg/mL), estimulador da proliferação de linfócitos B (ANTAL-SZALMÁS, 2000). Após 48 h, foram adicionados 0,02 mL de

uma solução contendo [2-¹⁴C]-timidina (0,02 µCi/poço) e as células foram cultivadas por um período adicional de 18 h, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Ao final das 66 h, as células foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo em papel filtro nº 11731. Neste procedimento, não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papel contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para flaconetes contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para contagem em contador Beckman LS 6000. A proliferação de linfócitos foi expressa como o índice de proliferação, calculado como: incorporação de [2-¹⁴C]-timidina após incubação com Con A ou LPS dividida pela incorporação de [2-¹⁴C]-timidina pelas células incubadas sem estímulo (valor com estímulo/valor sem estímulo).

4.14 Análise de Dados

Os dados foram analisados utilizando-se o pacote estatístico computacional STATISTICA™ versão 5.1. A probabilidade de erro tipo 1 adotada foi de α igual a 5%, enquanto a de erro tipo 2 foi de β igual a 20%. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade dos dados, em cada grupo, e o teste de Lévene, para analisar a homogeneidade entre as variâncias dos grupos.

Estatística paramétrica foi utilizada para análise do peso corporal inicial e final, concentrações plasmáticas de lactato, triacilglicerol, colesterol total e contagem diferencial de leucócitos. Neste caso, os dados foram expressos como média, erro padrão da média (EPM) e intervalo de confiança. Análise de variância (ANOVA) de duas vias (2 x 2) foi empregada para análise da interação entre os fatores disfunção (diabético x não-diabético) e aptidão física (treinado x não-treinado). ANOVA de duas vias para medidas repetidas (2 x 2 x 2) foi utilizada para análise da interação entre os fatores disfunção e aptidão física nos momentos pré e pós-experimental para a variável peso corporal. Aplicou-se o pós-teste de Tukey, quando verificado efeito significativo na ANOVA. Teste t de Student para amostras independentes foi utilizado para comparar as concentrações séricas de lactato após a sessão aguda de exercício entre os grupos treinado e diabético-treinado.

Estatística não-paramétrica foi empregada para analisar peso corporal durante as seis semanas de experimentação, consumo alimentar e hídrico, glicemia, funcionalidade de neutrófilos e linfócitos. Os dados não-paramétricos foram expressos como mediana, primeiro e terceiro quartis. Teste de Kruskal-Wallis foi empregado para verificar diferenças entre os grupos e ANOVA de Friedman para verificar diferenças entre os momentos (semanas 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Quando encontradas diferenças significativas, utilizou-se os testes de Mann-Whitney e Wilcoxon, respectivamente, para localizar as diferenças. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros Analisados Durante o Período Experimental

Os grupos diabético e diabético-treinado apresentaram menor peso corporal ($P<0,01$) do que os grupos controle e treinado a partir da primeira semana de treinamento até o final do período de experimentação (Figura 10). A partir da terceira semana de treinamento, ratos treinados apresentaram menor peso corporal ($P<0,01$) comparados com ratos controle, permanecendo esta diferença até o final do período de experimentação.

Ao longo do período experimental, o peso corporal dos ratos controle e treinados aumentou ($P<0,01$) progressiva e significativamente em relação ao dia de indução do diabetes, enquanto que seus pares diabéticos não apresentaram alteração significativa ($P<0,01$) (Apêndice 1). Comparando os momentos pré e pós-treinamento, o peso corporal dos ratos controle e treinados aumentou 44,4% e 29,0%, respectivamente ($P<0,01$), enquanto que seus pares diabéticos apresentaram redução significativa de 16,2% e 16,6%, respectivamente ($P<0,01$) (Tabela 1). Ao final do período experimental, ratos diabéticos apresentaram menor peso corporal quando comparado ao de ratos controle (42,5%; $P<0,01$); o mesmo foi observado com magnitude similar, nos animais diabéticos-treinados (35,5%; $P<0,01$) comparados com os diabéticos. Além disso, os ratos treinados apresentaram menor peso corporal do que os ratos do grupo controle (10,0%; $P<0,01$).

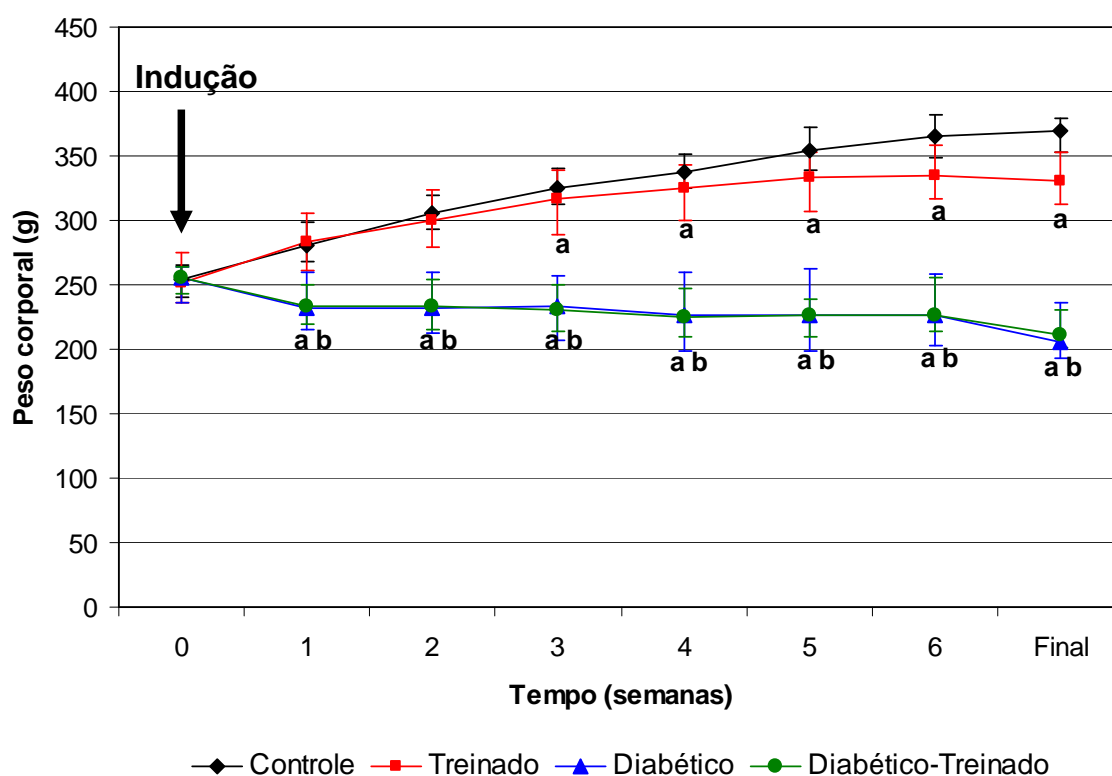


Figura 10 – Peso corporal (g) dos grupos controle (n=18), treinado (n=17), diabético (n=17) e diabético-treinado (n=16) durante seis semanas de experimentação. Tempo 0 (zero) corresponde ao dia de indução do diabetes e tempo final corresponde ao dia da ortotanásia. Valores foram expressos como mediana, primeiro e terceiro quartis de quatro experimentos. ^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. ^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado. Vide apêndice 1 para comparações entre os momentos.

Tabela 1 – Peso corporal (g) nos momentos pré e pós-treinamento e variação absoluta (Δ) e relativa ($\Delta\%$) do peso corporal entre os dois momentos dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado. Valores foram expressos como média \pm EPM (intervalo de confiança) de quatro experimentos.

	Peso corporal Pré (g)	Peso corporal Pós (g)	Δ%
Controle (n=18)	257 ± 5 (213-300)	369 ± 5 [#] (328-410)	44,4 ± 2,2 (26,0-62,7)
Treinado (n=17)	258 ± 6 (207-310)	332 ± 6 ^{a #} (285-379)	29,0 ± 2,3 ^a (10,1-47,9)
Diabético (n=17)	254 ± 5 (213-295)	212 ± 9 ^{a b #} (135-289)	-16,2 ± 3,5 ^{a b} (-45,8-13,3)
Diabético-Treinado (n=16)	257 ± 5 (216-298)	214 ± 7 ^{a b #} (159-270)	-16,6 ± 2,0 ^{a b} (-32,4- -0,8)
F _{diabetes}	168,71 [*]		420,37 [*]
F _{treino}	1,95		9,23 [*]
F _{tempo}	68,79 [*]		
F _{diabetes X treino}	3,58		8,37 [*]
F _{diabetes X tempo}	486,56 [*]		
F _{treino X tempo}	10,64 [*]		
F _{diabetes X treino X tempo}	9,71 [*]		

F = a distribuição F de Snedecor-Fisher determina a relação significativa entre a variável dependente e o conjunto de variáveis independentes.

^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado.

[#] $P < 0,01$ quando comparados momentos Pré e Pós-treinamento dentro do grupo.

* $P < 0,01$.

O consumo alimentar e hídrico dos animais diabéticos durante as seis semanas experimentais refletiram as condições de hiperfagia e polidipsia, características do diabetes mellitus (Figuras 11 e 12). Houve aumento significativo ($P < 0,01$) no consumo de ração (Tabela 2) pelos grupos diabético e diabético-treinado quando comparado ao dos demais grupos. O grupo diabético-treinado apresentou maior consumo de ração do que o grupo diabético (4,0%; $P < 0,05$). O mesmo cenário foi verificado para o consumo hídrico, exceto que os grupos diabéticos não diferiram entre si (Tabela 2).

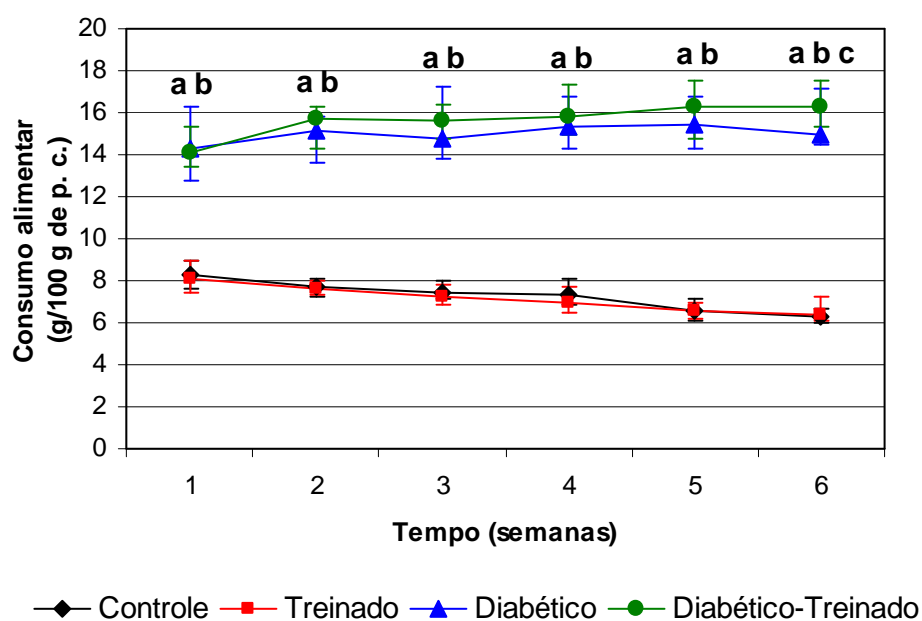


Figura 11 – Consumo alimentar (g/100 g de peso corporal (p. c.)) por 24 h dos grupos controle (n=23), treinado (n=22), diabético (n=22) e diabético-treinado (n=20) durante seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como mediana, primeiro e terceiro quartis de cinco experimentos. ^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. ^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado. ^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético. Vide apêndice 2 para comparações entre os momentos.

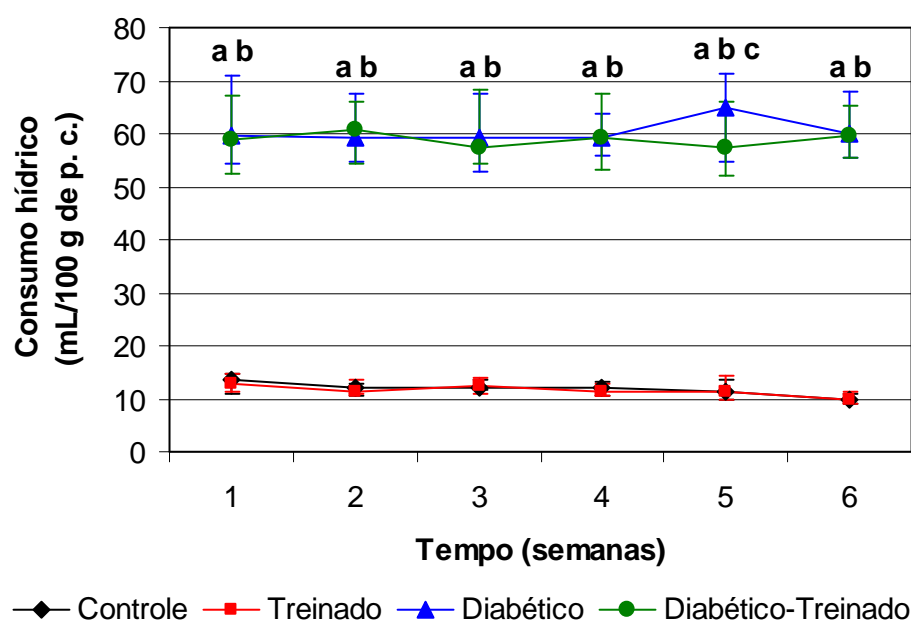


Figura 12 – Consumo hídrico (mL/100 g de peso corporal (p. c.)) por 24 h dos grupos controle (n=23), treinado (n=22), diabético (n=22) e diabético-treinado (n=20) durante seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como mediana, primeiro e terceiro quartis de cinco experimentos. ^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. ^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado. ^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético. Vide apêndice 3 para comparações entre os momentos.

Tabela 2 – Consumo médio alimentar (g/100 g de peso corporal (p. c.)) e hídrico (mL/100 g de p. c.) por 24 h dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como mediana (primeiro quartil-terceiro quartil) de cinco experimentos.

	Consumo alimentar (g/100 g de p. c.)	Consumo hídrico (mL/100 g de p. c.)
Controle (n=23)	7,2 (6,5-8,0)	11,6 (10,0-13,3)
Treinado (n=22)	7,1 (6,4-7,8)	11,6 (10,1-13,4)
Diabético (n=22)	15,1 ^{a b} (13,7-16,7)	60,4 ^{a b} (54,6-69,0)
Diabético-Treinado (n=20)	15,7 ^{a b c} (14,5-16,9)	59,1 ^{a b} (53,6-66,6)

^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado.

^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético.

5.2 Parâmetros Bioquímicos Sangüíneos

A glicemia (mediana (primeiro quartil-terceiro quartil)); mg/dL) no início do experimento foi de 127 (117-155) para o grupo controle, 140 (130-159) para o grupo treinado, 463 (427-476) para o grupo diabético e 431 (391-458) para o grupo diabético-treinado. As concentrações plasmáticas de glicose ao final de seis semanas de experimentação estavam elevadas em ambos os grupos diabéticos cerca de 3,4 vezes ($P < 0,01$) (Figura 13 e Tabela 3) confirmando-se assim, a manutenção do quadro de diabetes mellitus. A glicemia não teve nenhuma alteração decorrente do treinamento de saltos, enquanto este resultou em redução significativa nas concentrações plasmáticas de lactato em ratos não-diabéticos (15,2%; $P < 0,01$) (Figura 14 e Tabela 3).

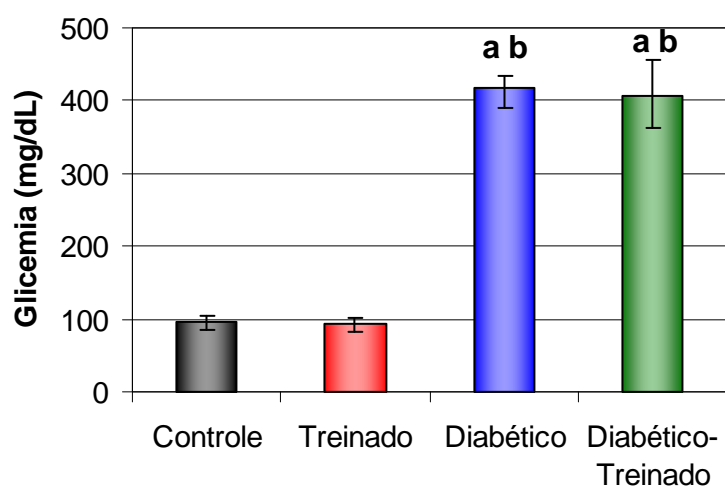


Figura 13 – Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) em repouso dos grupos controle (n=23), treinado (n=20), diabético (n=21) e diabético-treinado (n=19) ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como mediana, primeiro e terceiro quartis de cinco experimentos. ^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. ^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado.

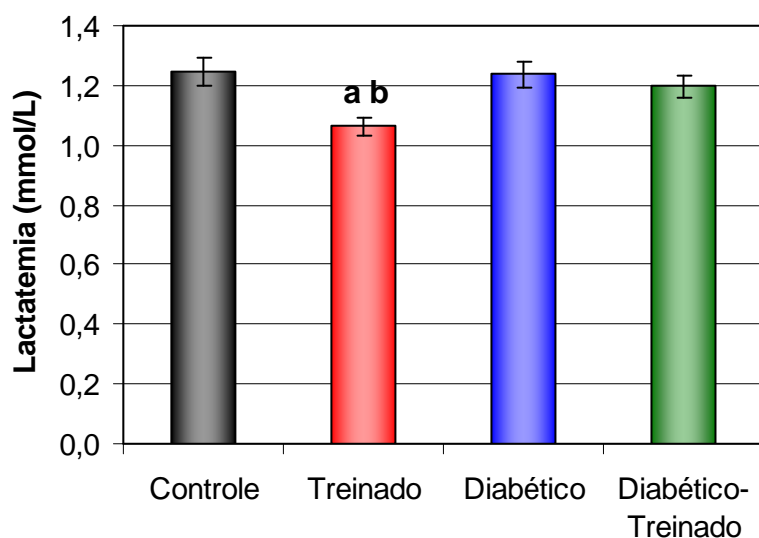


Figura 14 – Concentrações plasmáticas de lactato (mmol/L) em repouso dos grupos controle (n=22), treinado (n=21), diabético (n=21) e diabético-treinado (n=19) ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como média \pm EPM de cinco experimentos. ^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. ^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo diabético.

Tabela 3 – Resumo das concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) e lactato (mmol/L) em repouso dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como mediana (primeiro quartil-terceiro quartil) e média \pm EPM (intervalo de confiança) de cinco experimentos para glicemia e lactatemia, respectivamente.

	Glicose (mg/dL)	Lactato (mmol/L)
Controle (n=23, 22)	95 (84-105)	1,25 \pm 0,05 (0,82-1,68)
Treinado (n=20, 21)	93 (83-103)	1,06 \pm 0,03 ^{a c} (0,79-1,33)
Diabético (n=21, 21)	418 ^{a b} (391-433)	1,24 \pm 0,04 (0,83-1,64)
Diabético-Treinado (n=19, 19)	406 ^{a b} (364-455)	1,20 \pm 0,04 (0,85-1,54)
F_{diabetes}		2,28
F_{treino}		7,68*
$F_{\text{diabetes X treino}}$		3,16

F = a distribuição F de Snedecor-Fisher determina a relação significativa entre a variável dependente e o conjunto de variáveis independentes.

^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado.

^c $P < 0,01$ quando comparado com o grupo diabético.

* $P < 0,01$.

As concentrações plasmáticas de TAG foram significativamente superiores ($P < 0,01$) nos ratos diabéticos quando comparadas com as de ratos controle (32,9%), treinados (44,8%) e diabéticos-treinados (44,8%) (Figura 15 e Tabela 4). Concentrações plasmáticas de colesterol total não apresentaram alterações decorrentes do treinamento físico tampouco do diabetes (Figura 16 e Tabela 4).

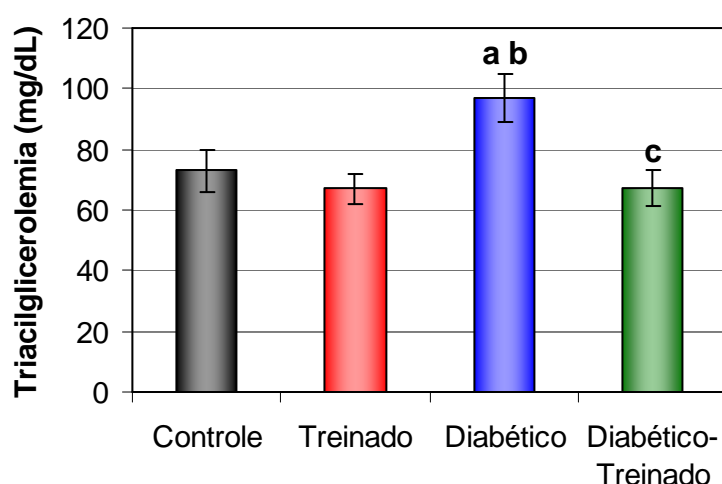


Figura 15 – Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (mg/dL) em repouso dos grupos controle (n=19), treinado (n=20), diabético (n=20) e diabético-treinado (n=17) ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como média \pm EPM de cinco experimentos. ^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. ^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado. ^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético.

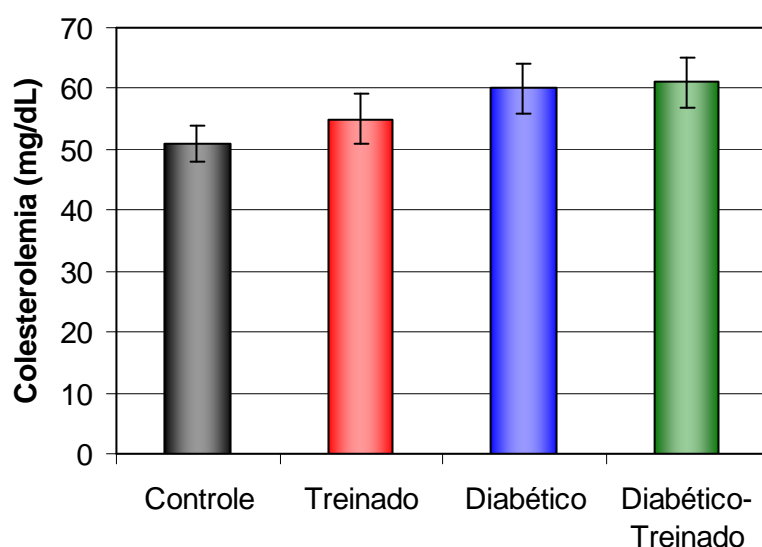


Figura 16 – Concentrações plasmáticas de colesterol total (mg/dL) em repouso dos grupos controle (n=22), treinado (n=21), diabético (n=21) e diabético-treinado (n=19) ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como média \pm EPM de cinco experimentos.

Tabela 4 – Resumo das concentrações plasmáticas de lipídios circulantes (mg/dL) em repouso dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como média \pm EPM (intervalo de confiança) de cinco experimentos.

	Triacilglicerol (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)
Controle (n=19, 22)	73 \pm 7 (13-132)	51 \pm 3 (27-76)
Treinado (n=20, 21)	67 \pm 5 (20-113)	55 \pm 4 (21-89)
Diabético (n=20, 21)	97 \pm 8 ^{a b} (26-169)	60 \pm 4 (24-95)
Diabético-Treinado (n=17, 19)	67 \pm 6 ^c (18-116)	61 \pm 4 (25-98)
F _{diabetes}	3,46	3,94
F _{treino}	7,65*	0,54
F _{diabetes X treino}	3,36	0,12

F = a distribuição F de Snedecor-Fisher determina a relação significativa entre a variável dependente e o conjunto de variáveis independentes.

^a $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado.

^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético.

* $P < 0,01$.

Quadro 1 –Resumo do efeito do diabetes e do treinamento de saltos sobre os parâmetros bioquímicos sanguíneos analisados.

	Diabetes	Treino	Treino em diabéticos
Glicemia	↑	NA	NA
Lactatemia	NA	↓	NA
Triacilglicerolemia	↑	NA	↓
Colesterolemia	NA	NA	NA

↑ – aumento decorrente do tratamento.

↓ – redução decorrente do tratamento.

NA – nenhuma alteração decorrente do tratamento.

5.3 Parâmetros Imunitários

Ratos diabéticos apresentaram significativa linfocitopenia em relação aos seus pares controle (41,6% para controle e 40,1% para treinados; $P < 0,01$) (Figura 17). O treinamento de saltos provocou redução adicional na porcentagem de linfócitos de ratos diabéticos (24,3%; $P < 0,05$). Comportamento inverso foi observado quanto à porcentagem de neutrófilos sanguíneos, onde o grupo diabético apresentou maiores valores quando comparado aos grupos controle e treinado (50,7% e 34,0%, respectivamente; $P < 0,01$); o treinamento de saltos conduziu a aumento adicional nesta variável (27,2%; $P < 0,01$). O treinamento de saltos acarretou redução significativa na porcentagem de monócitos sanguíneos tanto em ratos controle quanto diabéticos (47,3% e 48,7%, respectivamente; $P < 0,05$), enquanto o diabetes experimental não resultou em nenhuma alteração nesta variável.

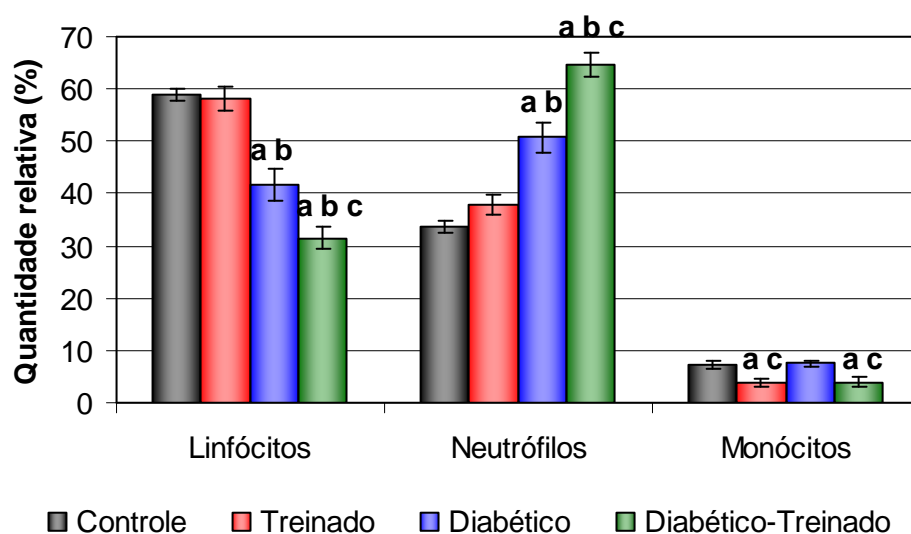


Figura 17 – Contagem diferencial de leucócitos sangüíneos (%) dos grupos controle (n=10), treinado (n=8), diabético (n=10) e diabético-treinado (n=8) ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como média \pm EPM de três experimentos. ^a $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle. ^b $P < 0,05$ quando comparado com o grupo treinado. ^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético. Vide apêndice 4 para tabela de valores.

Neutrófilos sangüíneos de ratos diabéticos não apresentaram modificações significativas na sua capacidade fagocítica em relação aos ratos controle (Figura 18 e Tabela 5). Entretanto o treinamento de saltos resultou em maior capacidade fagocítica tanto em ratos treinados quanto em ratos diabéticos-treinados em relação aos ratos controle (63,8% e 66,7%, respectivamente; $P < 0,05$) e diabéticos (51,7% e 54,4%, respectivamente; $P < 0,05$). Neutrófilos de ratos treinados, bem como diabéticos apresentaram maior produção de ânion superóxido (Figura 19 e Tabela 5) em relação ao grupo controle (98,5% e 73,8%, respectivamente; $P < 0,01$). Além disso, o grupo diabético-treinado apresentou maior produção desta espécie reativa de oxigênio quando comparado com todos os demais grupos (198,5%, 50,4% e 71,7% em relação aos grupos controle, treinado e diabético, respectivamente; $P < 0,01$).

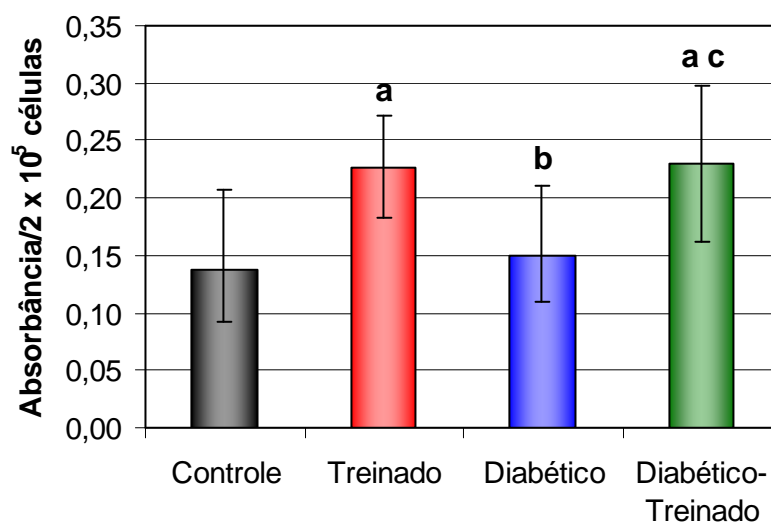


Figura 18 – Capacidade fagocítica de neutrófilos sangüíneos (absorbância/2 x 10⁵ células) dos grupos controle (n=18), treinado (n=17), diabético (n=17) e diabético-treinado (n=15) ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como mediana, primeiro e terceiro quartis de quatro experimentos, resultando em média em 15 repetições por grupo. ^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. ^b $P < 0,05$ quando comparado com o grupo treinado. ^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabéticos.

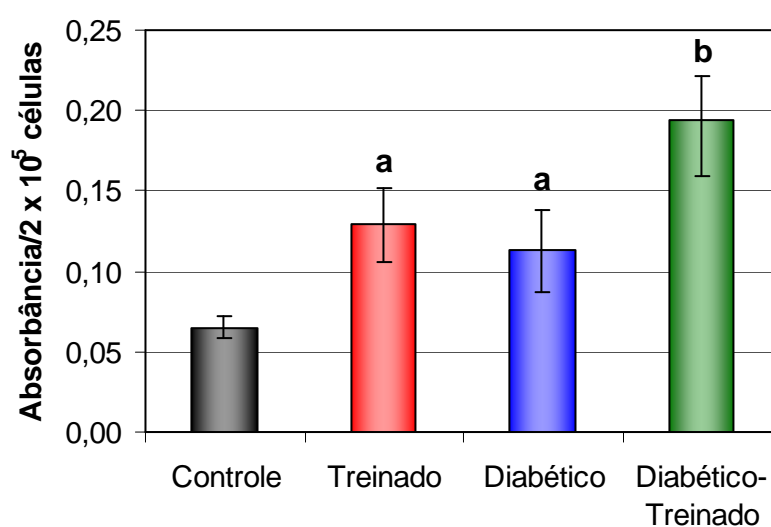


Figura 19 – Produção de ânion superóxido pelos neutrófilos sangüíneos (absorbância/2 x 10⁵ células) dos grupos controle (n=18), treinado

(n=16), diabético (n=19) e diabético-treinado (n=16). Valores foram expressos como mediana, primeiro e terceiro quartis de quatro experimentos, resultando em média em 13 repetições por grupo. ^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle. ^b $P < 0,01$ quando comparado com os demais grupos.

Tabela 5 – Resumo dos dados funcionais de neutrófilos sangüíneos (absorbância (abs.)/2 X 10^5 células) dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como mediana (primeiro quartil-terceiro quartil) de quatro experimentos.

	Capacidade Fagocítica (abs./2 x 10^5 células)	Ânion Superóxido (abs./2 x 10^5 células)
Controle (n=18, 18)	0,138 (0,093-0,208)	0,065 (0,058-0,072)
Treinado (n=17, 16)	0,226 (0,183-0,272) ^a	0,129 (0,106-0,152) ^d
Diabético (n=17, 19)	0,149 (0,109-0,210) ^b	0,113 (0,087-0,138) ^d
Diabético-Treinado (n=15, 16)	0,230 (0,162-0,298) ^{a c}	0,194 (0,159-0,222) ^e

^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,05$ quando comparado com o grupo treinado.

^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético.

^d $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

^e $P < 0,01$ quando comparado com os demais grupos.

A proliferação basal dos linfócitos (mediana; contagem por minuto – cpm), do grupo controle foi de 155, no treinado de 71, no diabético de 81 e no diabético-treinado de 205. O estímulo com Con A elevou a proliferação dos linfócitos T do grupo controle em 7,4 vezes (1298 cpm), do grupo treinado em 17,6 vezes (1323 cpm), do grupo diabético em 36,5 vezes (3036 cpm) e do grupo diabético-treinado em 24,3 vezes (5187 cpm). Para os linfócitos B estimulados com LPS, houve aumento no grupo controle de 3,5 vezes (698 cpm), no treinado de 5,5 vezes (463 cpm), no diabético de 3,1 vezes (329 cpm) e no diabético-treinado de 2,4 vezes (706 cpm) (Apêndice 5). O treinamento de saltos não provocou efeito diferente do observado para o controle sobre a proliferação basal de linfócitos, bem como estimulada com Con A ou LPS. A proliferação de linfócitos T estimulados com Con A

foi significativamente maior ($P<0,01$) no grupo diabético quando comparada à dos grupos controle e treinado (229,6% e 495,9%; respectivamente) (Figura 20). O treinamento de saltos reduziu significativamente a proliferação de linfócitos T estimulados com Con A nos ratos diabéticos-treinados (81,2%; $P<0,05$) comparados com diabéticos, contudo a proliferação no grupo diabético-treinado continuou superior ($P<0,01$) à de ratos controle (89,4%) e treinados (242,5%). Em contrapartida, a proliferação de linfócitos B estimulados com LPS de ratos diabéticos foi significativamente inferior à de ratos controle, treinados e diabéticos-treinados (25,6%, 42,0% e 32,6%, respectivamente; $P<0,05$).

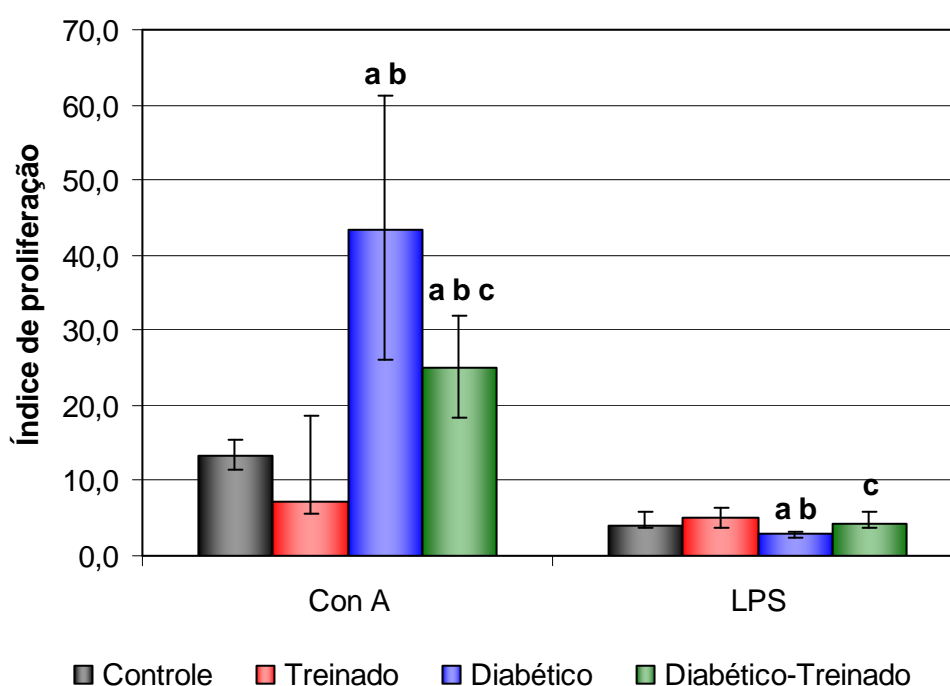


Figura 20 – Índice de proliferação (valor com estímulo/valor sem estímulo) de linfócitos mesentéricos cultivados por 66 h sob estímulo dos mitógenos concanavalina A (Con A) ou lipopolissacarídeo (LPS) dos grupos controle (n=14), treinado (n=12), diabético (n=14) e diabético-treinado (n=13) ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como mediana, primeiro e terceiro quartis de três experimentos, resultando em média em 16 repetições por grupo. ^a $P<0,01$ quando comparado com o grupo controle. ^b $P<0,01$ quando

comparado com o grupo treinado. ^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético. Vide apêndice 6 para tabela de valores.

Quadro 2 – Resumo dos efeitos do diabetes e do treinamento de saltos sobre a contagem diferencial de leucócitos sangüíneos, capacidade fagocítica e produção de ânion superóxido por neutrófilos e proliferação de linfócitos estimulados com concanavalina A (Con A) ou lipopolissacarídeo (LPS).

	Diabetes	Treino	Treino em diabéticos
Linfócitos	↓	NA	↓↓↓
Neutrófilos	↑	NA	↑↑↑
Monócitos	NA	↑	↑
Capacidade fagocítica	NA	↑	↑
Ânion superóxido	↑	↑	↑↑↑
Proliferação com Con A	↑	NA	↓
Proliferação com LPS	↓	NA	↑

↑ – aumento decorrente do tratamento.

↑↑ – aumento adicional decorrente do tratamento.

↓ – redução decorrente do tratamento.

↓↓ – redução adicional decorrente do tratamento.

NA – nenhuma alteração decorrente do tratamento.

6 DISCUSSÃO

A taxa de mortalidade da amostra foi de 8% para o grupo controle, 12% para os grupos treinado e diabético e 20% para o grupo diabético-treinado. O número de animais que morreram durante o treinamento, provavelmente devido a afogamento, nos grupos treinado e diabético-treinado foi de três animais por grupo. A maior taxa de mortalidade do grupo diabético-treinado deve-se a sedação excessiva em éter a qual os animais foram submetidos para coleta de sangue para dosagem da glicemia inicial dos animais (um rato) e pela constatação da reversão do diabetes (glicemia < 250 mg/dL) (um rato). Portanto, o diabetes induzido com estreptozotocina não aumentou a probabilidade de perda de ratos durante o treinamento. A sedação excessiva em éter para dosagem da glicemia inicial causou a perda de mais dois animais, um do grupo controle e outro do grupo diabético. No grupo controle, um rato morreu por perda de peso corporal excessiva sem causa diagnosticada, enquanto o diabetes experimental conduziu a perda de dois animais do grupo diabético. Em suma, três por cento da mortalidade total da amostra ocorreu pela sedação inadequada em éter, ao passo que o modelo de treinamento de saltos proposto no presente estudo causou 12% de perda de animais dos grupos treinados.

O diabetes mellitus é importante problema de saúde pública. Sua incidência e prevalência estão aumentando, alcançando proporções epidêmicas, além de associar-se a complicações que comprometem a produtividade, qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. Além disso, o seu controle metabólico e tratamento de suas complicações acarretam altos custos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003). Ao final de 2007, estima-se que cerca de 246 milhões de pessoas no mundo tenham diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2007). Estimava-se que em 30 anos (2000 a 2030) a prevalência aumentasse 114% (WILD et al., 2004), contudo, em sete anos já se verificou aumento de 44%, indicando que estas estimativas para 2030 estão subestimadas.

A maior prevalência é de indivíduos com diabetes tipo 2 (90-95%), o qual apresenta como principal característica a resistência à insulina com ou sem redução da sua secreção (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005). Esta maior prevalência provavelmente resulta do fato de acometer indivíduos em idades mais avançadas e estar estreitamente relacionado ao estilo de vida do indivíduo. Por outro lado, o diabetes tipo 1 inicia principalmente na infância e na adolescência e o

indivíduo necessita de insulina exógena para sobreviver (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005).

Os animais diabéticos apresentaram hiperfagia ao longo do período experimental (Figura 11), provavelmente devido à deficiência de insulina, uma vez que a insulina e a leptina são creditadas inibir neurônios do núcleo arqueado que coexpressam neuropeptídeo Y e peptídeos relacionados à cepa agouti, moléculas estas que potencialmente estimulam o consumo alimentar. Concomitantemente, concentrações basais de insulina e de leptina também ativam uma população neuronal adjacente ao núcleo arqueado, a qual expressa pró-opiomelanocorticotropina, que é processada e liberada como hormônio estimulador de melanócitos (α -MSH), reduzindo o consumo alimentar e aumentando o gasto energético (GELLING, 2006). A liberação de grelina é creditada responsável pela hiperfagia diabética, pois DONG et al. (2006) mostraram que este hormônio aumentou a expressão de neuropeptídeo Y e reduziu a expressão de α -MSH. Além disto, em ratos *knock-out* para grelina, a indução de diabetes não aumentou a expressão de neuropeptídeo Y. Adicionalmente, a deficiente utilização de glicose pelas células do núcleo ventromedial do hipotálamo também contribui para a hiperfagia diabética. Quando a utilização de glicose no núcleo ventromedial do hipotálamo é baixa, sua atividade é diminuída, acarretando sensação de fome.

Devido à utilização inadequada de glicose no diabetes, há intensa degradação protéica para produção de energia, que, conjuntamente, com a deficiência em sintetizar ácidos graxos a partir de carboidratos e aminoácidos, e a aumentada velocidade de oxidação de lipídios, provavelmente foram responsáveis pelo menor peso corporal dos ratos diabéticos ao final do período experimental (Tabela 1), mesmo apresentando hiperfagia. Ratos controle e treinados apresentaram aumento significativo de peso corporal ao longo das seis semanas de experimentação, ao passo que os ratos diabéticos não apresentaram modificação significativa (Figura 10).

A insulina estimula o crescimento e diferenciação celular promovendo o armazenamento de substratos no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético estimulando lipogênese, síntese de glicogênio e proteínas, e inibindo lipólise, glicogenólise e degradação protéica (SALTIEL; KAHN, 2001). A redução da produção de insulina pelas células β pancreáticas acarreta profunda desregulação desses processos, resultando em elevação da concentração plasmática pós-prandial

e de jejum de glicose e lipídios, como constatado no presente estudo (Figuras 13 e 15), além de déficit no crescimento corporal (Tabela 1) e no armazenamento de substratos energéticos. As concentrações plasmáticas de glicose encontraram-se elevadas cerca de 3,4 vezes em ambos os grupos diabéticos em relação aos animais controle. A hiperglicemia aumenta osmolaridade do fluido extracelular, o que desloca a água do compartimento intracelular para o extracelular, causando desidratação celular. Em condições hiperglicêmicas, o limiar renal para reabsorção de glicose é excedido e glicose é excretada na urina (glicosúria), resultando em diurese osmótica com perda de água e eletrólitos na urina acarretando hipovolemia e depleção de eletrólitos (ELEDRISI et al., 2006). Alterações no volume e osmolaridade dos fluidos corporais estimulam osmorreceptores e pressoreceptores no sistema nervoso central. Em resposta a hipovolemia, angiotensina II é liberada agindo como um neurotransmissor em neurônios sensíveis a angiotensina II em estruturas cerebrais, tais como órgão subfornicial ou órgão vascular da lâmina terminal, estimulando a sede (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). Esta área cerebral também possui osmorreceptores envolvidos na liberação de vasopressina em resposta a osmolaridade aumentada. Portanto, o aumento da osmolaridade causado por hiperglicemia, conjuntamente com a hipovolemia devido à poliúria em indivíduos diabéticos, estimula a sede, como caracterizado pelo elevado consumo hídrico pelos ratos diabéticos (Figura 12).

O quadro de diabetes foi confirmado no presente estudo pela hiperfagia, polidipsia, menor peso corporal, hiperglicemia e hiperlipidemia. O mesmo quadro foi encontrado por ROGATTO (2004), induzindo diabetes experimental com aloxana (35 mg/kg de peso corporal; i. v.), adicionalmente verificou-se hipoinsulinemia nos grupos diabéticos. OTTON (2001) também encontrou aumento no consumo alimentar e hídrico, já a partir do quarto e segundo dia, respectivamente, após indução de diabetes com aloxana (40 mg/kg de peso corporal; i. v.).

Ratos diabéticos também apresentam disfunção no metabolismo lipídico (uma vez que a insulina age aumentando a lipogênese e inibindo a lipólise no tecido adiposo) acarretando maior lipemia como confirmado pelas concentrações plasmáticas de TAG, que foram 53,5% superiores em ratos diabéticos (Figura 15). Nossos achados corroboram os de ROGATTO (2004), que adicionalmente verificaram maiores valores de colesterol total em ratos diabéticos, diferente do

presente estudo que não encontrou alteração significativa nesta variável (Figura 16). OTTON (2001), analisando ratos diabéticos por sete dias, verificou resultados similares de indicadores lipídicos e colesterol total aos encontrados por ROGATTO (2004) após seis semanas de diabetes. A diferença na colesterolemia entre nossos resultados e os dos demais estudos citados provavelmente decorra da condição alimentar dos animais no dia da análise, visto que nossos animais permaneceram em jejum prévio a coleta das amostras, ao passo que os demais autores analisaram os animais alimentados, podendo provocar diferenças individuais que não necessariamente reflitam diferenças entre os grupos experimentais.

O diabetes é considerado fator de risco independente para doença arterial coronariana. A doença cardiovascular é a principal responsável pela redução da sobrevida de pacientes diabéticos, sendo a causa mais freqüente de mortalidade, além disso, hipertensão arterial é duas vezes mais freqüente em indivíduos diabéticos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001). No diabetes mellitus há diminuição da produção de óxido nítrico pelas células endoteliais através do bloqueio da ativação realizada pela insulina da enzima óxido nítrico sintase endotelial (MUIS et al., 2005b). Concomitantemente, a insulina também aumenta a liberação de endotelina 1, potente vasoconstritor e mitógeno. Além disso, a hiperglicemia aumenta a produção de ERO, especialmente ânion superóxido na célula muscular lisa e vascular, provocando danos adicionais (BECKMAN; CREAGER; LIBBY, 2002).

A hiperglicemia, hipoinsulinemia e/ou hiperlipidemia diabética podem acarretar algumas complicações crônicas micro (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doença coronariana, arterial periférica e cerebrovascular). Nesse sentido, o modelo de diabetes crônico induzido por estreptozotocina mimetiza sinais e sintomas de algumas complicações crônicas verificadas em seres humanos, em particular, disfunção cardíaca diastólica, catarata e neuropatia (WEI et al., 2003), sendo o grau de catarata aumentado já a partir da quarta semana de diabetes. Estes autores, acompanhando ratos durante 24 semanas após administração de estreptozotocina (65 mg/kg de peso corporal; i. v.), não verificaram desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão.

Pacientes diabéticos, mesmo submetidos a tratamento com insulina, apresentam maior risco de aterosclerose, devido à dose acumulativa de insulina exógena (MUIS et al., 2005a) ou ao inadequado tratamento glicêmico (SOCIEDADE

BRASILEIRA DE DIABETES, 2003). Portanto, intervenções não-farmacológicas capazes de mimetizar alguns efeitos da insulina, reduzindo sua necessidade exógena, são relevantes no tratamento de indivíduos diabéticos. RAMALHO et al. (2006) verificaram redução significativa na dose de insulina em indivíduos submetidos a 12 semanas de treinamento físico.

É bem estabelecido na literatura que o treinamento físico é capaz de diminuir o risco de doenças cardiovasculares, além de reduzir o depósito de lipídios no tecido adiposo e a lipemia, sobretudo, por aumento na mobilização e utilização de ácidos graxos. Parâmetros cardiovasculares como pressão arterial e frequência cardíaca também podem ser modulados positivamente pela prática regular de exercícios físicos. Treinamento com pesos diminui a frequência cardíaca e pressão arterial sistólica frente a um protocolo de esteira, além de aumentar colesterol contido em lipoproteínas de alta densidade (HDL-C), tolerância à glicose e reduzir a resistência periférica à insulina e o risco para alguns tipos de cânceres (WINETT; CARPINELLI, 2001).

O protocolo de treinamento anaeróbio de saltos proposto no presente estudo não acarretou modificações significativas no peso corporal e nas concentrações plasmáticas de glicose, TAG e colesterol total em ratos controle após jejum de, no mínimo, 12 h, corroborando os achados de ROGATTO (2004), utilizando um protocolo de quatro séries de 10 saltos com um minuto de intervalo com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal, cinco vezes por semana durante seis semanas. Adicionalmente, NUNES (2005), submetendo ratos a oito semanas de treinamento de saltos, consistindo de 10 séries de 30 s de saltos com um minuto de intervalo entre as séries com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal, também não verificou modificações significativas no peso corporal e nas concentrações plasmáticas de glicose, TAG e colesterol total de ratos alimentados.

ROGATTO (2001), utilizando o mesmo protocolo empregado por ROGATTO (2004), não verificou modificações significativas nas concentrações plasmáticas de lactato dentro de 48 h após a última sessão de treinamento, sendo corroborado por NUNES (2005), enquanto que, no presente estudo, verificamos redução significativa neste parâmetro. Esta discrepância provavelmente ocorreu por diferenças no protocolo utilizado, uma vez que ROGATTO (2001) utilizaram menor volume (quatro *versus* seis séries), maior frequência (cinco *versus* quatro sessões semanais) e diferente forma de adicionar a sobrecarga ao animal (preso à cauda

versus colete acoplado ao tórax) em relação ao presente estudo. Enquanto que NUNES (2005), apesar de empregar mesma frequência e forma de adicionar a sobrecarga que o presente estudo, diferiu no volume (10 séries de 30 s *versus* seis séries de 10 saltos) e duração (oito *versus* seis semanas) do treinamento.

O protocolo proposto no presente estudo foi caracterizado por predominantemente anaeróbio, uma vez que os ratos ao final da sexta série da penúltima sessão de treinamento apresentaram concentrações séricas de lactato acima de 4,0 mmol/L considerada limiar entre o treinamento predominantemente aeróbio para anaeróbio (GOBATTO et al., 2001). Os ratos dos grupos treinado (n=6) e diabético-treinado (n=6) apresentaram concentrações séricas médias de lactato (média \pm EPM) de $5,7 \pm 0,3$ mmol/L e $5,8 \pm 0,4$ mmol/L, respectivamente, não sendo verificada diferença significativa entre os grupos ($P=0,80$). Estas concentrações são similares às encontradas por ROGATTO (2001) (6,2 mmol/L), contudo, esperava-se que o maior número de séries empregado no presente estudo (seis *versus* quatro) resultasse em maior lactacidemia. Especula-se que esta hipótese não foi confirmada devido ao diferente aparelho utilizado para dosagem de lactato (Yellow Springs® *versus* Accusport®), uma vez que foi verificado que o Accusport® subestima as concentrações de lactato superiores a 5 mmol/L em relação às dosagens realizadas pelo aparelho Yellow Springs® (FRANCHINI et al., 2004).

O diabetes mellitus diminui o armazenamento de carboidratos por reduzir a captação de glicose dependente de insulina pelo fígado e músculos esqueléticos. O transporte de glicose estimulado pela insulina é dependente da ativação de PI3-K, enquanto que o mecanismo de sinalização utilizado pela contração muscular, apesar de ainda não precisamente identificado, independe da ação desta enzima (GOODYEAR; KAHN, 1998; RITCHER et al., 2004). A sinalização pela contração muscular que desencadeia o aumento na translocação de GLUT4 para a membrana plasmática parece envolver dois níveis: cálcio intracelular e a enzima AMPK (JESSEN; GOODYEAR, 2005; RICHTER et al., 2004; RYDER; CHIBALIN; ZIERATH, 2001). Portanto, a contração muscular é capaz de aumentar a captação de glicose mesmo em condições hipoinsulinêmicas, podendo auxiliar o controle da glicemia de indivíduos diabéticos. Contudo, ratos diabéticos sem tratamento com insulina não possuem este benefício, como confirmado no presente estudo, uma vez que a glicemia de jejum não foi afetada por seis semanas de treinamento de saltos, o que corrobora o verificado na literatura, onde muitos

estudos não demonstraram um efeito independente do treinamento físico em melhorar o controle glicêmico de pacientes com diabetes tipo 1 (ZINMAN et al., 2004). ROGATTO (2004) também não verificou modificações significativas no peso corporal, consumo alimentar e hídrico e glicemia decorrentes de seis semanas de treinamento de saltos com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal tanto em ratos controle quanto diabéticos, confirmando a incapacidade do protocolo de treinamento de saltos proposto por ROGATTO (2001), bem como o nosso, de reverter a hiperglicemia de ratos diabéticos sem tratamento com insulina.

Ao contrário da glicemia, o protocolo de treinamento empregado no presente estudo, reduziu as concentrações plasmáticas de TAG dos ratos diabéticos a valores similares aos dos ratos controle, provavelmente, refletindo a maior utilização de ácidos graxos livres como substrato energético no músculo durante e após o exercício físico ou sua maior utilização para produção de energia ou neoglicogênese no fígado. O treinamento de saltos empregado no presente estudo resultou em alterações similares às encontradas por ROGATTO (2004) para ácidos graxos livres, contudo, dosando-se TAG.

Nossos resultados corroboram outros estudos que objetivaram analisar o efeito de um protocolo de treinamento anaeróbio sobre parâmetros bioquímicos em modelos animais. FARRELL et al. (1999a), utilizando modelo experimental de diabetes induzido por pancreatectomia, não verificaram modificações decorrentes de oito semanas de treinamento com pesos sobre a glicemia e insulinemia de ratos. A sessão consistia de 50 saltos em direção a uma barra iluminada localizada elevada na parede oposta da caixa até tocá-la, com frequência de três sessões semanais. Sobrecarga era adicionada com um colete e aumentada progressivamente durante o período de treinamento. O treinamento com pesos manteve a capacidade aguda de elevar a síntese protéica mesmo com concentrações de insulina 73,5% inferiores nos ratos diabéticos, sem efeito do treinamento crônico. Também foi verificado aumento significativo de fator de crescimento similar à insulina (IGF)-1 após treinamento com pesos por oito semanas somente nos animais diabéticos, provavelmente visando manter o estímulo anabólico protéico, concomitante a aumento na síntese protéica na porção vermelha do músculo gastrocnêmio. O treinamento intermitente de saltos, similar ao do presente estudo, aumentou a concentração total de proteínas na porção branca e na

porção vermelha do músculo gastrocnêmio dos ratos diabéticos (44,4% e 25,3%, respectivamente) (ROGATTO, 2004).

Pacientes com diabetes mellitus possuem suscetibilidade e severidade a infecções aumentada. A primeira linha de defesa do organismo contra microorganismos é o sistema imunitário efetor não-específico, principalmente os fagócitos, tais como os neutrófilos polimorfonucleares, que possuem grande variedade de funções que consistem em uma seqüência de eventos incluindo quimiotaxia, fagocitose e morte microbiana.

É bem estabelecido na literatura que o exercício físico agudo altera o número de leucócitos circulantes tanto após exercício físico em esteira com intensidade moderada, intensa ou até exaustão (PEAKE et al., 2005; TAULER et al., 2004; YAMADA et al., 2002) quanto após exercício com pesos (POTTEIGER et al., 2001; SIMONSON; JACKSON, 2004). O exercício físico aumenta agudamente as concentrações de alguns hormônios de estresse na circulação, incluindo epinefrina, norepinefrina, hormônio do crescimento, β -endorfinas, testosterona, estrógeno e cortisol, enquanto reduz às de insulina (KRAEMER; RATAMESS, 2005). Parece que o efeito agudo do exercício físico sobre linfócitos é mediado por catecolaminas, em particular a epinefrina (STEENSBERG et al., 2001), enquanto que a redução de linfócitos pós-exercício é mediada por ambos os hormônios epinefrina e cortisol.

Por outro lado, poucos estudos investigaram o efeito crônico do exercício físico sobre o número de leucócitos circulantes. A maioria dos estudos com este objetivo utilizou delineamento transversal por meio de amostra previamente treinada, o que dificulta a análise devido a variabilidade do nível, tempo e tipo de treinamento dos indivíduos. MILES et al. (2003), submetendo mulheres não-treinadas a três e seis semanas de treinamento com pesos, não verificaram modificações significativas na contagem total, bem como diferencial de leucócitos circulantes após uma sessão de seis séries de 10 repetições a 75% de 1-RM. KILGORE et al. (2002) não encontraram modificações em repouso em levantadores de peso treinados, após seis semanas de treinamento olímpico. Nosso estudo corrobora estes achados, utilizando ratos Wistar como modelo experimental, exceto para a porcentagem de monócitos, a qual o treinamento físico reduziu significativamente. Similarmente OLIVEIRA, ROGATTO e LUCIANO (2002) não verificaram modificações significativas no número de leucócitos totais, bem como neutrófilos, linfócitos e eosinófilos sangüíneos, após seis semanas de treinamento,

consistindo de quatro séries de 10 saltos com 50% do peso corporal, com aumento no número de monócitos. Utilizando o mesmo protocolo de treinamento, ROGATTO e LUCIANO (2002) encontraram neutrocitopenia (24,2%) e linfocitose (22,2%) decorrentes do treinamento, sem alterações significativas em monócitos. Portanto, a divergência na literatura entre as adaptações na porcentagem circulante de monócitos é grande (sem alteração, redução e aumento), merecendo análises adicionais que conduzam a um consenso ou que verifiquem o motivo de tais discrepâncias, uma vez que isto ainda não está claro na literatura. A redução no número de monócitos verificada no presente estudo pode ser uma adaptação positiva, visando diminuir a liberação de mediadores inflamatórios que são produzidos por estas células. Outra hipótese é que estas células foram redistribuídas para os tecidos que sofreram lesão durante o treinamento.

OLIVEIRA, ROGATTO e LUCIANO (2002) não verificaram efeito do diabetes experimental induzido com aloxana sobre leucócitos circulantes. Em contraposição, o presente estudo encontrou linfocitopenia e neutrofilia em animais diabéticos (Figura 17). Esta discrepância talvez seja decorrente da substância química utilizada para indução do diabetes, uma vez que utilizamos estreptozotocina, ao passo que OLIVEIRA, ROGATTO e LUCIANO (2002) utilizaram aloxana. SYBIRNA et al. (2006) verificaram maior número de linfócitos e menor número de neutrófilos em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 tratados com insulina quando comparados com um grupo de indivíduos saudáveis, sem alterações quanto a contagem de leucócitos, eosinófilos e monócitos circulantes. Portanto, o comportamento de linfócitos sangüíneos dos ratos diabetizados com estreptozotocina foi oposto ao de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 tratados com insulina (linfocitopenia *versus* linfocitose e neutrofilia *versus* neutrocitopenia), ressaltando a importância do controle do diabetes sobre o sistema imunitário. Nossos resultados corroboram o verificado com o modelo de camundongos *non-obese diabetic* (NOD), que desenvolvem diabetes tipo 1 espontaneamente (RUIZ et al., 2007), bem como com ratos diabetizados com duas doses de aloxana (MIRANDA, 2005). Nossos resultados, utilizando modelo de hiperglicemia crônica (diabetes) corroboraram os de VON KÄNEL, MILLS e DIMSDALE (2001), que encontraram linfocitopenia duas horas após um teste oral de tolerância a glicose, ou seja, hiperglicemia aguda. O número de neutrófilos tende a aumentar em indivíduos diabéticos provavelmente pela menor aderência destes ao endotélio decorrente da

hiperglicemia (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999). O treinamento de saltos, diferente do observado em ratos saudáveis, conduziu a modificações na porcentagem de linfócitos e neutrófilos sangüíneos em direção a acentuar o efeito do diabetes.

NABI et al. (2005) verificaram redução na capacidade fagocítica de partículas de zimosan opsonizado e não-opsonizado por neutrófilos peritoneais de ratos diabetizados por sete dias. Comportamento similar foi verificado por ALBA-LOUREIRO et al. (2006) em neutrófilos peritoneais de ratos diabetizados por duas semanas, com reversão deste quadro, seguindo administração subcutânea diária de 2-4 unidade internacional (UI) de insulina *neutral protamina hagedorm* (NPH) por rato, dose que não foi suficiente para alterar a glicemia destes animais. Portanto, os autores sugerem que alterações na capacidade fagocítica de neutrófilos estejam atreladas a hipoinsulinemia, ao invés de hiperglicemia, hipótese fortalecida pelo aumento da capacidade fagocítica de partículas opsonizadas por neutrófilos sangüíneos após quatro horas de *clamp* hiperinsulinêmico/euglicêmico, onde foram infundidas concentrações de glicose de jejum e concentrações de insulina, que resultaram em um aumento de 3,7 vezes na insulinemia dos indivíduos (WALRAND et al., 2004; WALRAND et al., 2006). Em contrapartida, exposição *in vitro* a hiperinsulinemia, reduziu a capacidade fagocítica de neutrófilos de indivíduos saudáveis, sendo esta resposta dependente da ativação de PKC α e/ou PKC β , que pode interferir na montagem/desmontagem dinâmica e/ou distribuição de actina F, necessária para o processo de fagocitose (SAIEPOUR; SEHLIN; OLDENBORG, 2006).

No entanto, verificamos que neutrófilos sangüíneos de ratos diabéticos por seis semanas não apresentaram modificações significativas em sua capacidade de fagocitar partículas de zimosan não-opsonizado. O maior período que os animais ficaram expostos às condições diabéticas, no presente estudo, talvez conduziu a modificações que reverteram possíveis alterações ocorridas no início do quadro como encontrado por outros estudos (NABI et al., 2005; ALBA-LOUREIRO et al., 2006). Outra diferença é o procedimento para análise, visto que utilizamos método colorimétrico, enquanto outros autores utilizaram microscopia de luz.

Por outro lado, verificamos aumento significativo na produção de ânion superóxido por neutrófilos sangüíneos de ratos diabéticos, corroborando com os achados de NABI et al. (2005) com neutrófilos peritoneais de ratos diabetizados

por sete dias, utilizando, como no presente estudo, a técnica de redução de NBT. WALRAND et al. (2004) verificaram que um *clamp* hiperinsulinêmico/euglicêmico, onde foram infundidas concentrações de glicose de jejum e concentrações de insulina, que resultaram em um aumento de 3,7 vezes na insulinemia dos indivíduos, aumentou a produção de ERO por neutrófilos. Estes resultados, conjuntamente com o fato que a insulina aumenta a produção de ânion superóxido ativando NADPH oxidase via ativação de PKC, a hipoinsulinemia não parece responsável pelos nossos resultados, mas sim outras alterações decorrentes do diabetes.

A hiperglicemia pode ser uma das responsáveis por alterações em neutrófilos, uma vez que PERNER, NIELSEN e RASK-MADSEN (2003) verificaram que exposição de neutrófilos *in vitro* a elevadas concentrações de glicose (25 mM) resultou em menor produção de ânion superóxido pela técnica de redução de citocromo c, contudo, esta foi uma resposta a exposição aguda. Por outro lado, neutrófilos possuem RAGE em sua membrana plasmática (COLLISON et al., 2002), indicando possível função de AGE sobre estas células. Nesse sentido, WONG et al. (2002) verificaram aumento na produção *in vitro* de ERO por neutrófilos sangüíneos incubados com AGE-albumina, contudo, somente com estímulo secundário mecânico ou químico (fMLP). Enquanto BERNHEIM et al. (2001) encontraram aumento na produção de ânion superóxido por neutrófilos sangüíneos não-estimulados após exposição *in vitro* a diferentes concentrações do complexo AGE-albumina. Este aumento está atrelado a ativação da enzima NADPH oxidase, uma vez que a adição de inibidor deste complexo enzimático (iodônio difenileno) foi capaz de reverter as alterações causadas por AGE-albumina.

Corroborando estes dados provenientes de indivíduos saudáveis, KARIMA et al. (2005) verificaram maior produção de ânion superóxido por neutrófilos sangüíneos de pacientes diabéticos com moderado a mau controle glicêmico, avaliado pela concentração de HbA_{1C}, em comparação aos indivíduos com bom controle glicêmico. Portanto, a hiperglicemia verificada no presente estudo (Figura 13), pode acarretar aumento na formação de AGE, que provavelmente agiram em neutrófilos via RAGE aumentando a produção de ânion superóxido por estas células.

O protocolo de treinamento de saltos proposto no presente estudo foi capaz de aumentar tanto a capacidade fagocítica quanto a produção de ânion superóxido por neutrófilos sangüíneos (Figuras 18 e 19), corroborando dados de LEVADA-PIRES et al. (2007). Estes submeteram ratos Wistar a 11 semanas de

treinamento consistindo de uma hora de corrida em esteira a 60-70% do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2m\acute{a}x}$), e verificaram 24 h após a última sessão de treinamento, aumento significativo na capacidade fagocítica e produção de ERO por neutrófilos peritoneais. Adicionalmente, analisaram componentes do complexo NADPH oxidase de neutrófilos, não encontrando alteração significativa nos componentes de membrana $p22^{PHOX}$ e $gp91^{PHOX}$, enquanto os componentes citosólicos $p47^{PHOX}$ e $p67^{PHOX}$ aumentaram significativamente. Vale ressaltar que a fosforilação de $p47^{PHOX}$, que desencadeia o deslocamento dos componentes citosólicos em direção aos de membrana, é um passo limitante para a ativação do complexo enzimático NADPH oxidase (BABIOR, 2004). Portanto, a sua maior disponibilidade talvez aumente a possibilidade de ativação de NADPH oxidase.

Adicionalmente, o exercício físico modula o sistema imunitário pela ação de hormônios de estresse. A visão de que o estresse induzido pelo exercício físico é imunossupressivo merece um parêntese, uma vez que exercício moderado ou intenso, que não acarrete *overtraining*, aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos e neutrófilos (ORTEGA, 2003). Este aumento é modulado pela elevação nas concentrações dos hormônios cortisol, epinefrina, norepinefrina e hormônio do crescimento. Além disso, outros hormônios como os da tireóide, prolactina e β -endorfinas, liberados durante o exercício físico, também estimulam fagócitos. ORTEGA et al. (2005) verificaram que o aumento na fagocitose por neutrófilos após exercício físico moderado foi acompanhado por aumento somente de norepinefrina, sem alterações nas concentrações de cortisol e epinefrina imediatamente e 24 h após o exercício. Considera-se que o estímulo para fagocitose e outros mecanismos inatos durante exercício físico extenuante visem contrabalancear a atividade linfóide reduzida, prevenindo a entrada e sobrevivência de microorganismos em situações onde as respostas específicas estão deprimidas (ORTEGA, 2003).

Exercício físico regula a síntese de alguns fatores que influenciam o *burst* oxidativo por neutrófilos, tais como epinefrina, hormônio do crescimento, prolactina, peptídeo natriurético atrial, cortisol, IL-6 e aminoácidos (PEAKE et al., 2005). É atualmente sugerido que citocinas e outros peptídeos que são produzidos, expressos e liberados pelas fibras musculares e exercem efeitos parácrinos ou endócrinos sejam classificados como miocinas (FEBBRAIO; PEDERSEN, 2005; PEDERSEN et al., 2007). O exercício físico é capaz de aumentar a produção de miocinas pelo músculo esquelético, sobretudo IL-6, que pode aumentar o *burst*

oxidativo por neutrófilos, seguindo exercício físico moderado, enquanto suprime esta atividade após treinamento de alta intensidade (PEAKE, 2002). Nesse sentido, SUZUKI et al. (1999) demonstraram estreita associação entre IL-6 liberada pelo músculo esquelético e aumento das respostas de neutrófilos, sugerindo que esta citocina pode agir como um importante modulador da função de neutrófilos.

O diabetes e o treinamento isoladamente provocaram aumento similar na produção de ânion superóxido por neutrófilos, enquanto a interação destes dois fatores conduziu a aumento adicional, ou seja, o treinamento de saltos proposto no presente estudo resultou em maior aumento na produção de ânion superóxido por ratos diabéticos do que por ratos controle. Como mencionado anteriormente, o diabetes influenciou este parâmetro, provavelmente decorrente do aumento de AGE resultante de hiperglicemia, que via RAGE, ativam a enzima NADPH oxidase. Por outro lado, sugere-se que o treinamento de saltos aumentou a produção de ânion superóxido pelo aumento na produção de hormônios e miocinas, sobretudo IL-6, que são capazes de aumentar o *burst* oxidativo por neutrófilos. Portanto, o aumento adicional na produção de ânion superóxido por neutrófilos no presente estudo corrobora os indicativos da literatura de que o diabetes e o treinamento físico regulam o *burst* oxidativo por neutrófilos através de diferentes vias de sinalização que culminam na ativação da enzima NADPH oxidase.

Vale ressaltar que as informações atualmente encontradas na literatura sobre a relação do exercício físico e funcionalidade de neutrófilos são provenientes de protocolos de exercício físico predominantemente aeróbio de intensidades moderadas ou elevadas, contudo, se estas respostas também ocorrem após treinamento com pesos ainda não foi demonstrado. O presente estudo mostra que o treinamento predominantemente anaeróbio de saltos pode alterar a funcionalidade de neutrófilos sangüíneos. Portanto, são necessários estudos adicionais que confrontem nossos achados tanto em modelos animais, que nos permita análises mais profundas do comportamento destas células, bem como maior controle sobre as condições experimentais, quanto com seres humanos visando esclarecer se comportamentos similares são verificados.

No presente estudo, verificamos maior proliferação de linfócitos de ratos diabéticos estimulados com Con A em relação aos ratos controle (Figura 20), corroborando os dados apresentados por BATISTA (2006) mensurando proliferação de linfócitos obtidos de ratos diabetizados com estreptozotocina (60 mg/kg de peso

corporal; i. v.) por citometria de fluxo. Em contrapartida, OTTON et al. (2002), investigando ratos diabetizados com aloxana (40 mg/kg de peso corporal; i. v.), verificaram reduzida proliferação de linfócitos provenientes de linfonodos mesentéricos quando estimulados com Con A, bem como LPS, após sete dias da indução comparada com a dos ratos controle. A discrepância entre nossos resultados e os de BATISTA (2006) em relação aos de OTTON et al. (2002) provavelmente esteja atrelada a substância química utilizada para indução do quadro de diabetes, uma vez que a estreptozotocina induz diabetes tipo 1 por mecanismos imunitários, ativando linfócitos, enquanto a aloxana não leva a ativação de linfócitos (SZKUDELSKI; SZKUDELSKA, 2002). Além disso, nossas análises, bem como as de BATISTA (2006) foram realizadas com jejum prévio dos animais, enquanto OTTON et al. (2002) analisaram animais alimentados.

OTTON et al. (2002) também analisaram a possível função da hiperglicemia sobre a menor resposta proliferativa de linfócitos por eles encontrada. Linfócitos de ratos diabéticos estimulados com Con A apresentaram menor proliferação do que a de ratos controle em meio contendo 5 mM, bem como 10 mM de glicose (aproximadamente 99 e 198 mg/dL, respectivamente). No entanto, quando linfócitos de ambos os grupos foram expostos a meio contendo 20 mM de glicose (aproximadamente 396 mg/dL), não houve diferença significativa entre os grupos, ou seja, a proliferação de linfócitos provenientes de ratos controle estimulada com Con A foi reduzida a valores similares aos de animais diabéticos, refletindo participação da hiperglicemia diabética na proliferação linfocitária alterada nesses animais. A hiperglicemia pode também estimular linfócitos a produzirem citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL1- β , IL-6, IL-8 e IL-10) e componentes de estresse oxidativo *in vitro* em linfócitos T de humanos (STENTZ; KITABCHI, 2005).

Quando linfócitos mesentéricos foram estimulados com LPS, verificamos menores valores no grupo diabético comparado com o grupo controle, corroborando os dados de OTTON et al. (2002) para esta variável. Como mencionado anteriormente, estreptozotocina induz diabetes tipo 1 por resposta auto-imune similar ao verificado no diabetes tipo 1 em humanos, que é desencadeado por ativação de linfócitos T (ROEP, 2003). Portanto, esta substância química possivelmente modificou a resposta proliferativa somente de linfócitos T, como verificado no presente estudo com células estimuladas com Con A (mitógeno para

linfócitos T), enquanto a resposta de linfócitos B ao diabetes experimental possivelmente seja similar em modelos induzidos por aloxana ou estreptozotocina.

BATISTA (2006) também analisou a proliferação de linfócitos obtidos de outros órgãos linfóides (timo e baço), verificando resposta diferenciada em função da localização dos linfócitos. Linfócitos provenientes de linfonodos mesentéricos de ratos diabéticos apresentaram menor proliferação basal e maior proliferação quando estimulados com Con A, enquanto no timo verificou-se maior proliferação tanto basal quanto estimulada com Con A em animais diabéticos. No baço, não houve modificação significativa acarretada pelo diabetes tanto para dados basais quanto estimulados com Con A, bem como LPS. Estímulo com LPS também não modificou proliferação de linfócitos mesentéricos de animais diabéticos, ao passo que proliferação de linfócitos do timo estimulados com este mitógeno foi superior em diabéticos. Estas diferentes respostas proliferativas em função do órgão linfóide de onde os linfócitos foram isolados, merecem atenção em futuros estudos, considerando que na literatura ainda não existe consenso quanto às modificações específicas que o diabetes pode acarretar sobre linfócitos provenientes de diferentes tecidos.

Enquanto BATISTA (2006) não verificou modificação na proliferação de linfócitos do baço estimulados com 5 µg/mL de Con A em ratos diabetizados por 21 dias, SAKOWICZ-BURKIEWICZ et al. (2006) verificaram menor proliferação de linfócitos do baço estimulados com concentrações de 1,5 e 2,5 µg/mL de Con A em ratos diabetizados com estreptozotocina (75 mg/kg de peso corporal; i. v.) por 10 dias comparados com ratos controle. A resposta proliferativa de linfócitos T e B obtidos de diferentes órgãos linfóides secundários não se deve assumir isoladamente como resposta sistêmica, uma vez que estudos anteriormente citados demonstram resposta diferenciada em função do órgão linfóide de onde as células provêm. A resposta sistêmica é mais fielmente refletida pelo comportamento de linfócitos sanguíneos, os quais normalmente são analisados em estudos com seres humanos devido à relativa facilidade de obtenção de amostra (sangue), em contrapartida a dificuldade de obtenção de grande volume de sangue de ratos para isolamento de número suficiente de linfócitos para as análises.

Adicionalmente, os estudos acima mencionados diferem muito quanto ao delineamento experimental, o que dificulta a comparação entre seus resultados e o esclarecimento das modificações imunitárias acarretadas pelo

diabetes tipo 1, bem como a análise dos fatores que possivelmente contribuam para estas modificações. Vale ressaltar que o período experimental pode ser um importante contribuinte para as diferenças entre os estudos, uma vez que as modificações verificadas podem ser transitórias e resultados opostos podem simplesmente resultar de diferentes estágios do desenvolvimento do diabetes tipo 1.

O exercício com pesos de forma aguda é capaz de alterar a funcionalidade de linfócitos, considerando que seis séries de 10 RM no agachamento com dois minutos de intervalo aumentaram significativamente (15,8%) a proliferação de linfócitos sangüíneos estimulados com Con A em mulheres (DOHI et al., 2001). Contudo, poucos estudos analisaram o efeito crônico do exercício físico sobre a funcionalidade de linfócitos.

Nesse sentido, KWAK (2006) verificou aumento (311,4%) na proliferação de linfócitos do baço estimulados com Con A, bem como com LPS, 48 h após a última sessão de treinamento, que consistiu em 10 semanas de treinamento aeróbio composto por sessões de 30 a 60 min de natação em ratos da linhagem BALB/c. Estes achados corroboraram o estudo de CUNHA et al. (2004), que verificaram aumento na proliferação de linfócitos tanto do baço (21,6%) quanto de linfonodos mesentéricos (26,6%) estimulados com Con A, 24 h após a última sessão de 14 semanas de treinamento em esteira a 60-65% do $VO_{2máx}$ com aumento progressivo na velocidade. Contudo, MILES et al. (2003) verificaram que seis semanas de treinamento com pesos não foi capaz de alterar a resposta proliferativa de linfócitos T sangüíneos estimulados com Con A ou com PHA ao exercício físico agudo, consistindo de seis séries de 10 RM com dois minutos de intervalo.

Analizando somente efeitos crônicos do treinamento com pesos, MILES et al. (2002) verificaram tendência a menor proliferação de linfócitos T estimulados com PHA após seis semanas de treinamento com pesos tanto utilizando protocolo para força e potência quanto protocolo para hipertrofia em mulheres, enquanto linfócitos estimulados com Con A, bem como mitógeno *pokeweed* (estimulador de linfócitos B) não apresentaram modificação significativa. O treinamento de saltos proposto no presente estudo corrobora estes achados, uma vez que não alterou a proliferação de linfócitos mesentéricos em animais saudáveis. LEANDRO et al. (2006) não encontraram modificação na proliferação de linfócitos do baço, timo e linfonodos mesentéricos após oito semanas de treinamento de intensidade moderada (70% do $VO_{2máx}$), consistindo de 60 min de corrida em esteira.

Portanto, o treinamento proposto pelo presente estudo, provavelmente foi de intensidade moderada para estes animais, uma vez que não alterou a proliferação de linfócitos.

Por outro lado, o treinamento de saltos foi capaz de reverter os efeitos do diabetes, aumentando a proliferação de linfócitos estimulados com LPS para valores de ratos controle, e reduzindo a proliferação de linfócitos estimulados com Con A, contudo, esta se manteve superior aos valores de ratos controle. Uma vez que o treinamento de saltos não alterou a glicemia de ratos diabéticos, seu efeito sobre a proliferação de linfócitos destes ratos provavelmente não resulte da ação sobre as modificações nestas células decorrentes da hiperglicemia. O efeito do treinamento de saltos sobre a proliferação de linfócitos somente de ratos diabéticos talvez seja decorrente de alterações no padrão de citocinas liberadas pelos linfócitos *T helper*. O diabetes mellitus modifica o padrão de produção de citocinas aumentando a resposta de linfócitos Th2. O desenvolvimento de linfócitos Th1 ou Th2 é influenciado por estresse agudo ou crônico, lesões traumáticas, queimaduras, bem como exercício severo (ELENKOV; CHROUSOS; WILDER, 2000). Linfócitos Th1 estão relacionados com a função de monócito/macrófagos, a falta de ativação de Th1 torna o organismo suscetível a infecções (Figura 6; ELENKOV; CHROUSOS, 1999).

BATISTA (2006) verificou que a razão de citocinas produzidas por linfócitos Th1/Th2 foi significativamente menor em animais diabéticos, demonstrando resposta proliferativa em direção ao estímulo de linfócitos Th2 corroborando outros estudos (MENCACCI et al., 1993; SUN et al., 2005; YAMASHIRO et al., 2005). O treinamento provavelmente reverteu ou minimizou esta alteração, uma vez que o treinamento físico pode aumentar a razão de citocinas produzidas por Th1/Th2, sem alterar a resposta proliferativa de linfócitos T obtidos do baço ou de linfonodos mesentéricos (CUNHA et al., 2004). Exercício físico moderado parece direcionar o sistema imunitário para uma resposta de citocina Th1 enquanto exercício físico extenuante aumenta citocinas Th2 (MALM, 2004; OSTROWSKI et al., 1999). Portanto, apesar do treinamento no presente estudo não alterar a proliferação de linfócitos, talvez houve modificação no padrão Th1/Th2, enquanto que a possível alteração em direção a inversão Th2 para Th1 em ratos diabéticos teria conduzido a modificações na resposta proliferativa por estas células. As alterações na proliferação de linfócitos de ratos diabéticos decorrentes do treinamento de saltos

ocorreu também quando estimulados linfócitos B (LPS), portanto, alterações no padrão de ativação Th1/Th2 pode não responder completamente pelo efeito do treinamento sobre a proliferação de linfócitos de ratos diabéticos, possivelmente existindo outros fatores contribuintes ainda não estabelecidos na literatura.

7 CONCLUSÃO

- O treinamento anaeróbio de saltos reduziu a hipertriacilglicerolemia, sem modificar a polidipsia, hiperglicemia, laticidemia e colesterolemia dos animais investigados.

- O treinamento anaeróbio de saltos resultou em linfocitopenia sem alteração na porcentagem de monócitos circulantes em animais diabéticos, e aumentou a capacidade citotóxica de neutrófilos sangüíneos concomitante ao aumento na sua porcentagem circulante, enquanto não alterou a sua capacidade fagocítica.

- O treinamento anaeróbio de saltos melhorou a proliferação de linfócitos de animais diabéticos, elevando a de linfócitos B estimulados com LPS a valores de animais não-diabéticos e reduzindo à de linfócitos T estimulados com Con A, que apesar disso permaneceu elevada em relação à dos grupos não-diabéticos.

- Portanto, a prática crônica de exercício anaeróbio de saltos pode melhorar a capacidade fagocítica e produção de ânion superóxido por neutrófilos sangüíneos e a proliferação de linfócitos de animais diabéticos, bem como a sua lipemia, podendo reduzir o risco de infecções e o desenvolvimento de aterosclerose por esta população.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ALBA-LOUREIRO, T. C. et al. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **The Journal of Endocrinology**, v. 188, n. 2, p. 295-303, fev. 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 28, suppl. 1, p. S37-S42, jan. 2005.

ANTAL-SZALMÁS, P. Evaluation of CD14 in host defence. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n. 2, p. 167-179, fev. 2000.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiological Review**, v. 84, n. 1, p. 169-208, jan. 2004.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, mar. 1999.

BABIOR, B. M; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 342-344, jan. 2002.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 42-47, fev. 2004.

BATISTA, V. G. **Caracterização do perfil de ácidos graxos do timo, baço e linfonodo mesentérico de ratos diabéticos e os efeitos da suplementação com fosfatidilcolina sobre a composição lipídica das membranas e funcionalidade de células B e T**. Curitiba, 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BECKMAN, J. A.; CREAGER, M. A.; LIBBY, P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **JAMA**, v. 287, n. 19, p. 2570-2581, mai. 2002.

BERNHEIM, J. et al. *In vitro* effect of advanced glycation end-products on human polymorphonuclear superoxide production. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, n. 12, p. 1064-1069, dez. 2001.

BONATTO, S. J. et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, v. 231, n. 1-2, p. 56-62, set/out. 2004.

BØYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, suppl. 5, p. 9-15, jun. 1976.

BRESSON, D.; VON HERRATH, M. Mechanisms underlying type I diabetes. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, n. 3, p. 321-327, 2004.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, dez. 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, jun. 2005.

COLLISON, K. S. et al. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 3, p. 433-444, mar. 2002.

CUNHA, W. D. S. et al. Exercise restores immune cell function in energy-restricted rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 12, p. 2059-2064, 2004.

DOHI, K. et al. Lymphocyte proliferation in response to acute heavy resistance exercise in women: influence of muscle strength and total work. **European Journal of Applied Physiology**, v. 85, n. 3/4, p. 367-373, ago. 2001.

DONG, J. et al. Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. 2634-2642, jun. 2006.

ELEDRISI, M. S. et al. Overview of the diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. **American Journal of Medicine Science**, v. 331, n. 5, p. 243-251, mai. 2006.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. **Trends Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 9, p. 359-368, nov. 1999.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P.; WILDER, R. L. Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 94-105, 2000.

ENGEL, P. C.; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, v. 88, n. 2, p. 475-484, ago. 1978.

FARRELL, P. A. et al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 3, p. 1075-1082, set. 1999a.

FARRELL, P. A. et al. Regulation of protein synthesis after acute resistance exercise in diabetic rats. **American Journal of Physiology**, v. 276, 4 Pt 1, p. E721-E727, abr. 1999b.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and infection**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, nov. 2003.

FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? **Exercise and Sports Science Review**, v. 33, n. 3, p. 114-119, jul. 2005.

FEDELE, M. J. et al. Severe diabetes prohibits elevations in muscle protein synthesis after acute resistance exercise in rats. **Journal Applied Physiology**, v. 88, n. 1, p. 102-108, jan. 2000.

FRANCHINI, E. et al. Comparação dos analisadores de lactate accusport e yellow springs. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 12, n. 1, p. 39-44, 2004.

GALASSETTI, P. et al. Effect of antecedent hypoglycemia on counterregulatory responses to subsequent euglycemic exercise in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1761-1769, jul. 2003.

GEERLINGS, S. E.; HOEPELMAN, A. I. M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). **FEMS Immunology of Medicine Microbiology**, v. 26, n. 3/4, p. 259-265, dez. 1999.

GELLING, R. W. Diabetic hyperphagia – ghrelin in the driver's seat. **Endocrinology**, v.147, n. 6, p. 2631-2633, jun. 2006.

GOBATTO, C. A. et al. Caracterização da intensidade de exercício e do efeito de treinamento físico no modelo de natação de ratos Wistar. **Motriz**, v. 7, n. 1, p. S57-S62, jan. 2001.

GOODYEAR, L. J.; KAHN, B. B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annual Review Medicine**, v. 49, p. 235-261, 1998.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes atlas**. Disponível em: <<http://www.eatlas.idf.org>> acesso em: 26 mar. 2007.

JESSEN, N.; GOODYEAR, L. J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 1, p. 330-337, jul. 2005.

KARIMA, M. et al. Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 4, p. 862-870, out. 2005.

KILGORE, J. L. et al. Serum chemistry and hematological adaptations to 6 weeks of moderate to intense resistance training. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 16, n. 4, p. 509-515, nov. 2002.

KIRWAN, J. P.; AGUILA, L. F. Insulin signaling, exercise and cellular integrity. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, Pt 6, p. 1281-1285, dez. 2003.

KOSTYAK, J. C. et al. Severe diabetes inhibits resistance exercise-induced increase in eukaryotic initiation factor 2B activity. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 1, p. 79-84, jul. 2001.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. **Sports Medicine**, v. 35, n. 4, p. 339-361, 2005.

KWAK, Y. Effects of training on spleen and peritoneal exudates reactive oxygen species and lymphocyte proliferation by splenocytes at rest and after an acute bout of exercise. **Journal of Sports Sciences**, v. 24, n. 9, p. 973-978, set. 2006.

LEANDRO, C. G. et al. Physical training attenuates the stress-induced changes in rat T-lymphocyte function. **Neuroimmunomodulation**, v. 13, n. 2, p. 105-113, out. 2006.

LECKER, S. H. et al. Ubiquitin conjugation by the N-end rule and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 10, p. 1411-1420, nov. 1999.

LEVADA-PIRES, A. C. et al. Exercise training raises expression of the cytosolic components of NADPH oxidase in rat neutrophils. **European Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 2, p. 153-160, mai. 2007.

LICASTRO, F.; DAVIS, L. J.; MORINI, M. C. Lectins and superantigens: membrane interaction of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. **International Journal of Biochemistry**, v. 25, n. 6, p. 845-852, jun.1993.

LIU, Z. et al. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in heart vs skeletal muscle: effects of acute diabetes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 3, p. 1255-1260, out. 2000.

MADHAVI, N.; DAS, V. N. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the survival of vineristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro. **Cancer Letters**, v. 84, n. 1, p. 31-41, ago. 1994.

MALM, C. Exercise immunology: the current state of man and mouse. **Sports Medicine**, v. 34, n. 9, p. 555-566, set. 2004.

MENCACCI, A. et al. Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. II. Susceptibility to *Candida albicans* infection correlates with the induction of a biased Th2-like antifungal response. **Cellular Immunology**, v. 150, n. 1, p. 36-46, ago. 1993.

MILES, M. P. et al. Effects of resistance training on resting immune parameters in women. **European Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 6, p. 506-508, out. 2002.

MILES, M. P. et al. Strength, workload, anaerobic intensity and the immune response to resistance exercise in women. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 178, n. 2, p. 155-163, jun. 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Anuário Estatístico de Saúde do Brasil – 2001**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/anuario2001>> acesso em: 23 abr. 2007.

MIRANDA, D. T. S. Z. **Suplementação da dieta de ratos diabéticos com lecitina de soja: efeitos sobre funções de células do sistema imunitário e sobre concentrações plasmáticas de lipídios**. Curitiba, 2005. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MUIS, M. J. et al. High cumulative insulin exposure: a risk factor of atherosclerosis in type 1 diabetes? **Atherosclerosis**, v. 181, n. 1, p. 185-192, jul. 2005a.

MUIS, M. J. et al. Insulin treatment and cardiovascular disease; friend or foe? A point of view. **Diabetes Medicine**, v. 22, n. 2, p. 118-126, fev. 2005b.

NABI, A. H. M. et al. Polymorphonuclear neutrophil dysfunctions in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 6, p. 661-667, nov. 2005.

NUNES, E. A. **Efeito do treinamento de saltos e da suplementação com β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) sobre o crescimento tumoral, caquexia e parâmetros imunitários de ratos portadores do tumor de Walker 256**. Curitiba, 2005. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

OLIVEIRA, C. A. M.; ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 219-224, nov/dez. 2002.

ORTEGA, E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implications. **Exercise Immunology Review**, v. 9, p. 70-93, 2003.

ORTEGA, E. et al. Norepinephrine as mediator in the stimulation of phagocytosis induced by moderate exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 5/6, p. 714-718, mar. 2005.

OSTROWSKI, K. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **Journal of Physiology**, v. 515, Pt 1, p. 287-291, fev. 1999.

OTTON, R. **Metabolismo e função de linfócitos de ratos diabéticos**. São Paulo, 2001. 132 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

OTTON, R.; MENDONÇA, J. R.; CURTI, R. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. **The Journal of Endocrinology**, v. 174, n. 1, p. 55-61, jul. 2002.

OTTON, R. et al. Low proliferation capacity of lymphocytes from alloxan-diabetics rats: involvement of high glucose and tyrosine phosphorylation of Shc and IRS-1. **Life Sciences**, v. 71, n. 23, p. 2759-2771, out. 2002.

OTTON, R. et al. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. **The Journal of Endocrinology**, v. 182, n. 1, p. 145-156, jul. 2004.

PARLAPIANO, C. et al. The relationship between glycated hemoglobin and polymorphonuclear leukocyte leukotriene B4 release in people with diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 46, n. 1, p. 43-45, out. 1999.

PEAKE, J. M. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. **Exercise Immunology Review**, v. 8, p. 49-100, 2002.

PEAKE, J. M. et al. Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 37, n. 5, p. 737-745, mai. 2005.

PEDERSEN, B. K. et al. Role of myokines in exercise and metabolism. **Journal of Applied Physiology**, *in press*. 2007.

PELEG, A. Y. et al. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 23, n. 1, p. 3-13, jan. 2007.

PERNER, A.; NIELSEN, S. E.; RASK-MADSEN, J. High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. **Intensive Care Medicine**, v. 29, n. 4, p. 642-645, abr. 2003.

PIZATO, N. et al. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition and Cancer**, v. 53, n. 2, p. 194-201, 2005.

POTTEIGER, J. A. et al. Training status influences T-cell responses in women following acute resistance exercise. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 15, n. 2, p. 185-191, mai. 2001.

RAMALHO, A. C. et al. The effect of resistance versus aerobic training on metabolic control in patients with type-1 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 72, n. 3, p. 271-276, jun. 2006.

RICHTER, E. A. et al. Exercise signalling to glucose transport in skeletal muscle. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 2, p. 211-216, mai. 2004.

ROEP, B. O. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia**, v. 46, n. 3, p. 305-321, mar. 2003.

ROGATTO, G. P. **Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos Wistar**. Rio Claro, 2001. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biodinâmica do Movimento) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Perfil leucocitário de ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) submetidos ao exercício resistido crônico. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 1, p. 51-63, jun, 2002.

ROGATTO, G. P. **Exercício físico de alta intensidade e diabetes experimental: influências do treinamento sobre as variáveis metabólicas e endócrinas relacionadas ao estresse em ratos**. Rio Claro, 2004. 162 f. Tese (Doutorado em Biodinâmica do Movimento) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

RUIZ, F. S. et al. Sleep deprivation reduces the lymphocyte count in a non-obese mouse model of type 1 diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 5, p. 633-637, mai. 2007.

RYDER, J. W.; CHIBALIN, A. V.; ZIERATH, J. R. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 171, n. 3, p. 249-57, mar. 2001.

SAIEPOUR, D.; SEHLIN, J.; OLDENBORG, P. A. Insulin inhibits phagocytosis in normal human neutrophils via PKC α /beta-dependent priming of F-actin assembly. **Inflammation Research**, v. 55, n. 3, p. 85-91, mar. 2006.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, dez. 2001.

SAKOWICZ-BURKIEWICZ, M. et al. Diabetes-induced decrease of adenosine kinase expression impairs the proliferation potential of diabetic rat T lymphocytes. **Immunology**, v. 118, n. 3, p. 402-412, jul. 2006.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Interpretação laboratorial do leucograma**. São Paulo: Robe editorial, 2003.

SIMONSON, S. R.; JACKSON, C. G. R. Leukocytosis occurs in response to resistance exercise in men. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 18, n. 2, p. 266-271, mai. 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e Diretriz de prevenção da aterosclerose do Departamento da Sociedade Brasileira de Cardiologia, **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 77, supl. 3, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso brasileiro sobre diabetes 2002**: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2003.

STEENBERG, A. et al. Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 4, p. 1708-1712, out. 2001.

STENTZ, F. B.; KITABCHI, A. E. Hyperglycemia-induced activation of human T-lymphocytes with de novo emergence of insulin receptors and generation of reactive oxygen species. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, n. 2, p. 491-495, set. 2005.

SUN, N. et al. Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/c mice induces a dominant oxidative macrophage and a conversion of T_H1 to T_H2 phenotypes during disease progression. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 4, p. 202-209, ago. 2005.

SUZUKI, K. et al. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 4, p. 1360-1367, out. 1999.

SYBIRNA, N. et al. Mononuclear and polymorphonuclear leukocytes show increased fructose-1,6-bisphosphatase activity in patients with type 1 diabetes mellitus. **Cell Biology International**, v. 30, n. 7, p. 624-630. jul. 2006.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Reviews**, v. 50, n. 6, p. 536-546, jun. 2001.

SZKUDELSKI, T.; SZKUDELSKA, K. Streptozotocin induces lipolysis in rat adipocytes *in vitro*. **Physiological Research**, v. 51, n. 3, p. 255-259, mar. 2002.

TAULER, P. et al. Different effects of exercise tests on the antioxidant enzyme activities in lymphocytes and neutrophils. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 8, p. 479-484, ago. 2004.

VON KÄNEL, R.; MILLS, P. J.; DIMSDALE, J. E. Short-term hyperglycemia induces lymphopenia and lymphocyte subset redistribution. **Life Sciences**, v. 69, n. 3, p. 255-262, jun. 2001.

WALRAND, S. et al. In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 6, p. 1104-1110, dez. 2004.

WALRAND, S. et al. Insulin differentially regulates monocyte and polymorphonuclear neutrophil functions in healthy young and elderly humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 7, p. 2738-1748, jul. 2006.

WEI, M. et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. **Heart, Lung and Circulation**, v. 12, n. 1, p. 44-50, jan. 2003.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, mai. 2004.

WINETT, R. A.; CARPINELLI, R. N. Potential health-related benefits of resistance training. **Preventive Medicine**, v. 33, n. 5, p. 503-513, nov. 2001.

WONG, R. K. M. et al. Augmentation of the neutrophil respiratory burst through the action of advanced glycation end products: a potential contributor to vascular oxidant stress. **Diabetes**, v. 51, n. 9, p. 2846-2853, set. 2002.

YAMADA, M. et al. Raised plasma G-CSF and IL-6 after exercise may play a role in neutrophil mobilization into the circulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 5, p. 1789-1794, mai. 2002.

YAMASHIRO, S. et al. Lower expression of Th1-related cytokines and inducible nitric oxide synthase in mice with streptozotocin-induced diabetes mellitus infected with Mycobacterium tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 139, n. 1, p. 57-64, jan. 2005.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. M. M.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-787, dez. 2001.

ZINMAN, B. et al. Physical activity/exercise and diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, suppl. 1, p. S58-S62, jan. 2004.

APÊNDICES

- Apêndice 1** – Tabela dos valores de peso corporal dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante as seis semanas de experimentação.....83
- Apêndice 2** – Tabela dos valores de consumo alimentar por 24 h dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante seis semanas de experimentação.....84
- Apêndice 3** – Tabela dos valores de consumo hídrico por 24 h dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante seis semanas de experimentação.....85
- Apêndice 4** – Tabela dos valores de contagem diferencial de leucócitos sangüíneos dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação.....86
- Apêndice 5** – Tabela dos valores absolutos de proliferação de linfócitos mesentéricos por 66 h na ausência ou presença de estímulo com os mitógenos concanavalina A (Con A) ou lipopolissacarídeo (LPS)....87
- Apêndice 6** – Tabela dos valores do índice de proliferação de linfócitos mesentéricos por 66 h na ausência ou presença de estímulo com os mitógenos concanavalina A (Con A) ou lipopolissacarídeo (LPS)....88

Apêndice 1 – Peso corporal (g) dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante seis semanas (S) de experimentação. Tempo 0 (zero) corresponde ao dia de indução do diabetes e tempo final corresponde ao dia da ortotanásia. Valores foram expressos como mediana (Med), primeiro (Q1) e terceiro (Q3) quartis de quatro experimentos.

		0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Final
Controle (n=18)	Med	254	281*	306*	325*	337*	354*	365*	369*
	Q1	240	268	293	313	325	339	349	353
	Q3	265	298	320	340	352	372	382	379
Treinado (n=17)	Med	252	284*	300 ^{a*}	317 ^{a*}	325 ^{a*}	334 ^{a#}	335 ^{a#}	330 ^{a‡}
	Q1	236	261	279	289	300	307	316	312
	Q3	275	306	323	339	343	353	358	353
Diabético (n=17)	Med	255	232 ^{ab}	232 ^{ab}	233 ^{ab}	227 ^{ab}	227 ^{ab}	227 ^{ab}	205 ^{ab}
	Q1	236	215	212	207	198	199	203	193
	Q3	264	260	260	257	260	263	259	236
Diabético- Treinado (n=16)	Med	255	233 ^{ab}	233 ^{ab}	231 ^{ab}	225 ^{ab}	227 ^{ab}	226 ^{ab}	211 ^{ab}
	Q1	243	219	215	214	210	210	214	201
	Q3	264	250	254	250	247	239	255	230

^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,05$ quando comparado com o grupo treinado.

* $P < 0,01$ quando comparado com os demais momentos.

$P < 0,01$ quando comparado com os demais momentos, exceto Final.

‡ $P < 0,01$ quando comparado com os demais momentos, exceto S5 e S6.

Apêndice 2 – Consumo alimentar (g/100 g de peso corporal (p. c.)) por 24 h dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante seis semanas (S) de experimentação. Valores foram expressos como mediana (Med), primeiro (Q1) e terceiro (Q3) quartis de cinco experimentos.

		S1	S2	S3	S4	S5	S6
Controle (n=18)	Med	8,3	7,7 [#]	7,4 [#]	7,3 [#]	6,6 ^{#†‡§}	6,3 ^{#†‡§}
	Q1	7,6	7,2	7,1	6,9	6,1	6,0
	Q3	9,0	8,1	8,0	8,1	7,1	6,7
Treinado (n=17)	Med	8,1	7,6 [#]	7,2 [#]	7,0 ^{#†}	6,5 ^{#†‡}	6,4 ^{#†‡}
	Q1	7,4	7,3	6,9	6,5	6,2	6,1
	Q3	9,0	8,0	7,8	7,7	7,0	7,2
Diabético (n=17)	Med	14,3 ^{ab}	15,1 ^{ab}	14,8 ^{ab#}	15,3 ^{ab#}	15,4 ^{ab#†}	15,0 ^{ab#}
	Q1	12,8	13,6	13,8	14,3	14,3	14,5
	Q3	16,3	15,8	17,2	16,8	16,8	17,1
Diabético- Treinado (n=16)	Med	14,1 ^{ab}	15,7 ^{ab#}	15,6 ^{ab#}	15,8 ^{ab#}	16,3 ^{ab#}	16,3 ^{ab#†}
	Q1	13,4	14,3	14,8	15,0	14,8	15,3
	Q3	15,3	16,3	16,4	17,3	17,5	17,5

^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado.

^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético.

[#] $P < 0,05$ quando comparado com S1.

[†] $P < 0,05$ quando comparado com S2.

[‡] $P < 0,05$ quando comparado com S3.

[§] $P < 0,05$ quando comparado com S4.

Apêndice 3 – Consumo hídrico (mL/100 g de peso corporal (p. c.)) por 24 h dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado durante seis semanas (S) de experimentação. Valores foram expressos como mediana (Med), primeiro (Q1) e terceiro (Q3) quartis de cinco experimentos.

		S1	S2	S3	S4	S5	S6
Controle (n=18)	Med	13,4	11,9 [#]	12,2 [†]	11,9	11,3 ^{#§}	9,9 [‡]
	Q1	10,9	10,4	11,8	10,4	9,7	9,2
	Q3	14,9	12,9	13,5	13,2	13,6	10,9
Treinado (n=17)	Med	12,9	11,5 [#]	12,4	11,5 ^{#†}	11,4 [#]	9,8 [‡]
	Q1	11,4	10,8	10,9	10,5	9,7	8,9
	Q3	14,8	13,4	14,0	12,8	14,5	11,5
Diabético (n=17)	Med	59,7 ^{ab}	59,4 ^{ab}	59,3 ^{ab}	59,2 ^{ab}	65,0 ^{ab}	60,1 ^{ab}
	Q1	54,4	54,7	52,9	55,9	54,8	55,3
	Q3	70,8	67,6	67,6	63,7	71,2	68,0
Diabético- Treinado (n=16)	Med	58,8 ^{ab}	60,9 ^{ab}	57,5 ^{ab}	59,4 ^{ab}	57,3 ^{abc}	59,7 ^{ab}
	Q1	52,4	54,4	54,2	53,1	52,2	55,4
	Q3	67,2	66,0	68,2	67,7	66,0	65,4

^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado.

^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético.

[#] $P < 0,05$ quando comparado com S1.

[†] $P < 0,05$ quando comparado com S3.

[§] $P < 0,05$ quando comparado com S4 e S5.

[‡] $P < 0,05$ quando comparado com as demais semanas.

Apêndice 4 – Contagem diferencial de leucócitos sangüíneos (%) dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como média \pm EPM (intervalo de confiança) de três experimentos.

	Linfócitos (%)	Neutrófilos (%)	Monócitos (%)
Controle (n=10)	58,9 \pm 1,2 (51,1-66,8)	33,7 \pm 1,2 (26,1-41,2)	7,4 \pm 0,8 (2,1-12,7)
Treinado (n=8)	58,3 \pm 2,3 (45,5-71,0)	37,9 \pm 2,0 (26,8-48,9)	3,9 \pm 0,8 ^{a c} (-0,9-8,6)
Diabético (n=10)	41,6 \pm 3,0 ^{a b} (22,8-60,5)	50,8 \pm 2,8 ^{a b} (32,8-68,8)	7,6 \pm 0,6 (3,7-11,4)
Diabético-Treinado (n=8)	31,5 \pm 2,1 ^{a b c} (19,8-43,2)	64,6 \pm 2,2 ^{a b c} (52,1-77,1)	3,9 \pm 0,9 ^{a c} (-1,4-9,2)
F _{diabetes}	94,60*	101,89*	0,02
F _{treino}	5,72**	17,22*	19,91*
F _{diabetes X treino}	4,35	4,89**	0,01

^a $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,05$ quando comparado com o grupo treinado.

^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético.

* $P < 0,01$. ** $0,05 > P > 0,01$.

Apêndice 5 – Proliferação de linfócitos mesentéricos (contagem por minuto – cpm) cultivados por 66 h na ausência ou presença de estímulo com os mitógenos concanavalina A (Con A) ou lipopolissacarídeo (LPS) dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como mediana (primeiro quartil-terceiro quartil) de três experimentos, resultando em média em 16 repetições por grupo.

	Sem estímulo	Con A (cpm)	LPS (cpm)
Controle (n=14)	155 (69-191)	1298 (914-2427)	698 (245-1077)
Treinado (n=12)	71 (63-303)	1323 (516-1609)	463 (343-1160)
Diabético (n=14)	81 (50-106)	3036 ^{a b} (2775-3180)	329 (295-390)
Diabético-Treinado (n=13)	205 (43-286)	5187 ^{a b} (1741-5358)	706 (179-1626)

^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado.

Apêndice 6 – Índice de proliferação (valor com estímulo/valor sem estímulo) de linfócitos mesentéricos cultivados por 66 h sob estímulo dos mitógenos concanavalina A (Con A) ou lipopolissacarídeo (LPS) dos grupos controle, treinado, diabético e diabético-treinado ao final de seis semanas de experimentação. Valores foram expressos como mediana (primeiro quartil-terceiro quartil) de três experimentos, resultando em média em 16 repetições por grupo.

	Con A	LPS
Controle (n=14)	13,2 (11,4-15,4)	3,9 (3,7-5,8)
Treinado (n=12)	7,3 (5,7-18,6)	5,0 (3,8-6,3)
Diabético (n=14)	43,5 (26,0-61,2) ^{a b}	2,9 (2,4-3,3) ^{a b}
Diabético-Treinado (n=13)	25,0 (18,3-31,9) ^{a b c}	4,3 (3,7-5,9) ^c

^a $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

^b $P < 0,01$ quando comparado com o grupo treinado.

^c $P < 0,05$ quando comparado com o grupo diabético.

**ANEXO – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.**

ANEXO – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal.

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Setor de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética em Experimentação Animal
 (CEEAA)

**CERTIFICADO****Nº 133**

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEAA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEAA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no(a) Projeto de pesquisa abaixo especificado(a), estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).",

PROCESSO: 30995/05-52 **APROVADO:** RO-03/2005 08/08/2005

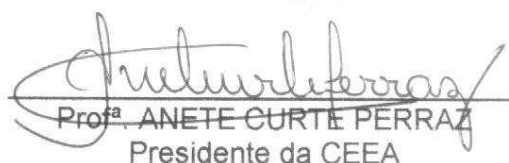
TÍTULO: "EFEITO DO TREINAMENTO DE FORÇA E DA SUPLEMENTAÇÃO COM β -HIDROXI β METHILBUTIRATO (HMB) SOBRE PARÂMETROS IMUNITÁRIOS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM INSULINA".

AUTORES: Luiz Cláudio Fernandes – responsável
 Carine Ferreira de Souza - Acadêmica

Colaboradores Gleisson Alisson P. Brito, Cristina Pessini, Cristiane V. Shigueoka
 Sérgio Ricardo Brito Belo e Luciéli Gerra Minuzzi,

DEPARTAMENTO: Fisiologia

Curitiba, 08 de agosto de 2005.


 Prof^a. ANETE CURTE PERRAZ
 Presidente da CEEA